

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



OCORRÊNCIA DA PATULINA EM ALIMENTOS DESTINADOS A LACTENTES E CRIANÇAS: OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE POR SPE-HPLC-UV

Maria João Mendes Mendonça Barreira

MESTRADO EM
CONTROLO DA QUALIDADE E TOXICOLOGIA DOS ALIMENTOS

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



OCORRÊNCIA DA PATULINA EM ALIMENTOS DESTINADOS A LACTENTES E CRIANÇAS: OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE POR SPE-HPLC-UV

Maria João Mendes Mendonça Barreira

Dissertação Orientada por:

- Doutora Paula Cristina C. O. Soromenho de Alvito
- Prof. Doutora Cristina M.M. Almeida

MESTRADO EM
CONTROLO DA QUALIDADE E TOXICOLOGIA DOS ALIMENTOS

2009

Resumo

A patulina é uma micotoxina produzida por certas espécies de fungos que, com frequência, contaminam maçãs e produtos derivados, particularmente sumo e puré de maçã, alimentos amplamente consumidos por crianças. Os estudos de toxicidade mostram que esta micotoxina é genotóxica, mutagénica, imunossupressora e neurotóxica.

Com o objectivo de estudar a ocorrência de patulina em alimentos destinados a lactentes e crianças jovens, optimizou-se e validou-se um método de extracção em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultra-violeta (SPE-HPLC-UV), o qual foi posteriormente utilizado na análise de sumos e purés à base de maçã.

O método SPE-HPLC-UV para a análise da patulina foi validado através da aplicação de diversos testes estatísticos que permitiram definir o intervalo de linearidade, a gama de trabalho, os limiares analíticos, a precisão, a exactidão e o efeito de matriz.

A optimização do método de ensaio teve início com os, principalmente, em estudos de estabilidade da patulina, nomeadamente, efeito do pH, da temperatura de conservação, do tempo de conservação e das condições de evaporação.

Os resultados dos ensaios de validação indicam que o método cromatográfico, HPLC-UV, é linear na gama de concentrações de 8 a 100 µg/L com limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), calculados com base em estudos de repetibilidade, de 0,84 µg/kg e 2,8 µg/kg, respectivamente.

O método global, SPE-HPLC-UV apresenta um LOD e um LOQ de 0,90 µg/kg e 2,9 µg/kg, respectivamente.

Nas três matrizes estudadas, sumo (límpido e turvo) e purés, o método de SPE-HPLC-UV é preciso apresentando um desvio padrão relativo inferior ou igual a 10%, em condições de precisão intermédia. As interferências de matriz foram avaliadas nas três matrizes, através de estudos de recuperação obtendo-se valores entre 56 e 77% em condições de repetibilidade e entre 61 e 78% em condições de precisão intermédia.

A exactidão do método foi avaliada com base nos resultados da participação em ensaios interlaboratoriais e com base na análise de materiais de referência e os resultados encontram-se dentro do critério de aceitação dos respectivos ensaios, mostrando que o método é exacto.

O método validado permitiu avaliar o nível de contaminação de 148 amostras, correspondentes a 87 amostras para alimentação infantil (10 sumos límpidos e 77 purés) e 61 amostras de sumo (40 turvos e 21 límpidos), as quais, representam 34 amostras de origem biológica e 114 amostras convencionais.

A patulina foi detectada em 38 amostras (26%) e quantificada em 21 (14%), apresentando uma contaminação média de $2,60 \pm 6,3 \mu\text{g/kg}$ e um valor máximo de $42 \mu\text{g/kg}$. A incidência de amostras positivas foi mais elevada em sumos turvos (67%) comparativamente com os sumos límpidos (13%) e purés (9%) e o valor médio de contaminação foi de $7,4 \pm 10,7 \mu\text{g/kg}$, $0,98 \pm 1,23 \mu\text{g/kg}$ e $0,78 \pm 0,80 \mu\text{g/kg}$ para sumos turvos, límpidos e purés, respectivamente. Nas 87 amostras para alimentação infantil, 10 sumos límpidos apresentaram níveis de contaminação inferiores ao LOD e 7 dos 77 purés apresentaram teores de patulina superiores ao LOD, com um máximo de $5,7 \mu\text{g/kg}$.

Estes resultados mostram que os níveis de patulina detectados nas amostras se encontram claramente abaixo dos valores limite regulamentados para alimentos à base de maçã destinados a lactentes e crianças jovens ($10 \mu\text{g/kg}$) e para sumos de fruta ($50 \mu\text{g/kg}$) indicando que a qualidade dos géneros alimentícios à base de maçã comercializados em Portugal é aceitável.

Palavras-chave: Alimentação infantil, HPLC-UV, maçã, micotoxinas, patulina, SPE.

Abstract

Patulin is a mycotoxin produced by certain species of fungi, often present in apples and apple derivatives like juice and puree, foodstuffs that are, in general, highly consumed by children. Patulin has been reported to be genotoxic, mutagenic, immunosuppressive and neurotoxic in several toxicological studies.

This study aims to study the occurrence of patulin particularly in apple-based baby foods using a SPE-HPLC-UV validated method.

The SPE-HPLC-UV method was validated through the application of several statistical methods, which allow defining the linearity, working range, analytical limits, repeatability, precision, accuracy and matrix effect.

The method optimization studies included the effect of several parameters concerning patulin stability, including the solvent pH, the storage temperature, the storage time and the evaporating conditions.

Validation results for chromatographic method, HPLC-UV, showed that the method is linear from 8 to 100 µg/L. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) based on repeatability studies were 0,84 µg/L and 2,8 µg/L, respectively.

Analytical limits of the global method, SPE-HPLC-UV, were 0,90 µg/kg and 2,9 µg/kg, for LOD and LOQ, respectively.

Under intermediate precision conditions the SPE-HPLC-UV method shows a good precision with a relative standard deviation equal or lower than 10% for the studied matrices (clear and cloudy juices and purees). Recovery studies used to assess matrix effects ranged from 56 to 77% under repeatability conditions and from 61% to 78% under intermediate precision conditions.

Results from interlaboratory proficiency tests and analysis of reference materials, showed that the method is accurate.

This SPE-HPLC-UV validated method was used to assess the contamination level of 148 apple based samples, including 87 baby foods (10 clear juices and 77 purees) and 61 juices (40 cloudy juices and 21 clear juices), corresponding to 34 and 114 organic and conventional foods, respectively.

Patulin was detected in 38 samples (26%) and quantified in 21 (14%) samples. Mean patulin concentration was $2,6 \pm 6,3$ µg/kg, with a maximum contamination value of 42 µg/kg. Incidence of positive samples was higher in cloudy juices (67%) compared to clear juices (13%) and purees (9%) and mean contamination levels were $7,4 \pm 10,7$ µg/kg, $0,98 \pm 1,23$ µg/kg and $0,78 \pm 0,80$ µg/kg for cloudy juices, clear juices and purees,

respectively. Concerning the 87 baby-food samples analysed, 10 infant drinks (clear) showed contamination levels below LOD and 7 purees (from a total of 77) had patulin levels above the LOD, with the highest contaminated puree containing 5,7 µg/kg.

These results were all below the legislated levels for apple juices and apple purees intended for infants and young children (10 µg/kg) and for fruit juices (50 µg/kg) indicating that the overall quality of apple based foods marketed in Portugal could be considered acceptable.

Key Words: Baby foods, HPLC-UV, apple, mycotoxins, patulin, SPE, validation

Agradecimentos

Começo por agradecer às minhas duas orientadoras, Doutora Paula Alvito e Prof. Doutora Cristina Almeida que, com enorme dedicação, disponibilidade e boa disposição contribuíram decisivamente para a elaboração desta tese de mestrado. Prestaram um apoio extraordinário durante a fase de planeamento do trabalho experimental e também durante a elaboração da tese, nomeadamente na organização da informação e correção dos textos. Acompanharam de perto o desenrolar de todo o trabalho, ajudando-me com firmeza e determinação a ultrapassar os momentos mais difíceis.

Quero agradecer à Vera Nunes que colaborou de forma extremamente empenhada, responsável e dedicada para a realização do trabalho laboratorial nomeadamente na análise de amostras. Ao Miguel Larginho e à Diana Martinho agradeço por todo o apoio prestado no decurso do trabalho experimental, durante a fase de optimização e também na análise de amostras. Aos três agradeço ainda os momentos de boa disposição que passámos juntos, entre sumos, purés e corridas de HPLC.

Agradeço à Dr^a Antónia Calhau, coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge INSA), por ter permitido a realização deste trabalho no seu Departamento.

Agradeço à Prof^a Doutora Matilde Castro, coordenadora do mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, pela organização de mais uma edição do referido mestrado e também por todo o apoio e simpatia que sempre demonstrou.

Gostaria também de agradecer à Dra. Adelina Gomes, anterior coordenadora do então Centro de Biopatologia (CBP) do INSA, por ter permitido a realização deste trabalho e também pelo apoio e amizade demonstrada ao longo dos anos em que trabalhamos juntas.

À Prof^a Doutora Isabel Loureiro, actual coordenadora do Departamento de Promoção da Saúde e Doenças Crónicas (DPSDC)(ex-CBP) e Dra. Maria Jorge Arroz, coordenadora das Unidades Laborial Integrada e Unidade Laboratorial de Referência do DPSDC, agradeço a permissão para concluir o trabalho experimental.

Agradeço também a todas as pessoas do DAN que de algum modo prestaram apoio laboratorial, em especial à Elsa Vasco por me desvendar todos os mistérios do funcionamento do HPLC, ao pessoal técnico e auxiliar do laboratório por todo o apoio prestado e disponibilidade que sempre demonstraram.

À Dra. Eleonora Paixão do Departamento de Epidemiologia agradeço a valiosa contribuição no tratamento estatístico dos resultados e à Dra Catarina Alves agradeço o excelente apoio na organização e tratamento estatístico inicial dos dados experimentais.

À Dra. Cristina Veríssimo e Doutora Laura Rosado do Laboratório de Micologia do INSA agradeço o precioso contributo na realização de análises micológicas a sumos de maçã.

Agradeço de forma especial aos colegas e amigos com quem trabalho ou já trabalhei porque me dão a força e a energia que necessito para alcançar os meus objectivos com persistência e determinação, particularmente a Elsa Alverca, a Teresa Ramos, a Ana Sofia Santos, a Filomena Sam-Bento a Catarina Alves, a Ana Margarida Medeiros, a Luciana Costa, a Liliana Marques, o João Banha, a Manuela Manso da Silva, a Cristina Cartaxo, Almeida a Dra Ilda Damas Mora e a Emília Magalhães.

Imprescindível tem sido o apoio fantástico da família e dos amigos, que são o meu “Porto Seguro”. Quero agradecer a todos os meus amigos, particularmente ao Nuno Ribeiro e à Cristina Santos que tantas vezes “adoptaram” os meus 3 meninos durante os fins de semana. À avó paterna agradeço a disponibilidade e paciência para tantas horas com os 3 netos e aos meus pais e aos meus 3 irmãos agradeço a imensa paciência, compreensão, carinho e disponibilidade sempre demonstrada durante a realização deste trabalho.

O maior e mais sentido agradecimento vai naturalmente para os meus três meninos, a Rita, a Sofia e o Pedro que são a minha fonte de inspiração e de imensa alegria.

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
Agradecimentos.....	v
Índice	vii
Índice de figuras	xiv
Índice de tabelas	xvii
Símbolos e abreviaturas.....	xxi
Introdução	1
Capítulo I - Micotoxinas	5
1. Generalidades	5
2. Vias de exposição	8
3. Ocorrência e toxicidade das principais micotoxinas	10
3.1. Aflatoxinas	10
3.2. Fumonisinhas.....	12
3.3. Ocratoxina A.....	13
3.4. Tricotecenos.....	15
3.5. Zearalenona	16
3.6. Alcalóides do Ergot	17
3.7. Patulina	18
4. Micotoxinas emergentes.....	19
Capítulo II - Patulina.....	21
1. Breve nota histórica	21
2. Caracterização química	21
3. Ocorrência da patulina em géneros alimentícios.....	22

4. Alimentos de origem biológica.....	26
5. Propriedades toxicológicas	27
5.1. Avaliação da exposição	30
5.2. Controlo da contaminação por patulina.....	32
Capítulo III - Aspectos regulamentares.....	37
1. Entidades oficiais	37
2. Teores máximos de patulina	39
3. Requisitos para amostragem	40
Capítulo IV - Metodologia analítica.....	45
1. Generalidades	45
2. Amostragem	45
3. Métodos de preparação da amostra.....	47
3.1. Extracção em fase líquida (LLE).....	48
3.2. Extracção em fase sólida (SPE).....	49
3.2.1. Desenvolvimento de um método de SPE	50
3.2.2. Adsorventes em SPE e mecanismos de retenção.....	51
3.2.3. Procedimentos gerais de preparação de amostras utilizando SPE.....	54
3.2.4. Selecção de solventes.....	56
3.3. Dispersão em fase sólida (MSPD)	57
4. Métodos de determinação de micotoxinas em alimentos.....	58
4.1. Análise de micotoxinas	59
4.2. Análise de patulina.....	60
5. Estudos da estabilidade da patulina	64
5.1. Efeito do pH.....	64
5.2. Efeito da temperatura de conservação	64
5.3. Efeito do tempo (curva de calibração).....	64
5.4. Efeito das condições de evaporação.....	65
6. Validação de métodos analíticos	65
6.1. Nota introdutória.....	65

6.2.	Descrição do método	67
6.3.	Grau de exigibilidade	68
6.4.	Avaliação indirecta	69
6.4.1.	Especificidade/Selectividade	69
6.4.2.	Curvas de calibração.....	70
6.4.2.1.	Linearidade	71
6.4.2.2.	Gama de trabalho	71
6.4.3.	Limiares analíticos	72
6.4.3.1.	Limite de detecção (LOD)	72
6.4.3.2.	Limite de quantificação (LOQ).....	73
6.4.4.	Sensibilidade.....	74
6.4.5.	Precisão	74
6.4.5.1.	Repetibilidade.....	74
6.4.5.2.	Precisão intermédia	76
6.4.5.3.	Reprodutibilidade.....	77
6.5.	Avaliação directa	78
6.5.1.	Materiais de referência certificados	78
6.5.1.1.	Erro Relativo	79
6.5.1.2.	Teste de hipótese (teste t).....	79
6.5.1.3.	Factor de desempenho z (“z-score”)	80
6.5.2.	Ensaio interlaboratoriais.....	80
6.5.3.	Testes comparativos.....	81
7.	Cartas de controlo	81
7.1.	Cartas de controlo de Shewart, de médias ou indivíduos.....	82
Capítulo V - Parte experimental		85
1.	Equipamento e material.....	85
1.1.	Equipamento.....	85
1.2.	Material	86
2.	Reagentes	87
2.1.	Gerais.....	87
2.2.	Padrões.....	87
3.	Soluções	88
3.1.	Soluções gerais	88

3.2.	Soluções de calibração	89
3.3.	Soluções padrão de fortificação.....	90
3.4.	Soluções padrão de controlo.....	90
3.4.1.	Controlos cromatográficos	90
3.4.2.	Controlos de fortificação.....	91
3.5.	Soluções para o estudo da estabilidade.....	91
3.5.1.	Efeito do pH.....	91
3.5.2.	Efeito da temperatura de conservação (amostras)	91
3.5.3.	Efeito do tempo (curva de calibração)	92
3.5.4.	Efeito das condições de evaporação (temperatura, pressão e tempo) ...	92
3.6.	Soluções para a optimização e validação do método	92
3.6.1.	Soluções para o estudo da selectividade.....	92
3.6.2.	Soluções padrão para o estudo da linearidade (SPLIN).....	93
3.6.3.	Soluções padrão para o estudo da homogeneidade de variância	93
3.6.4.	Soluções para o estudo dos limiares analíticos.....	93
3.6.4.1.	Método cromatográfico (HPLC-UV)	93
3.6.4.2.	Método global (SPE-HPLC-UV).....	94
3.6.5.	Soluções para o estudo da precisão.....	94
3.6.5.1.	Repetibilidade.....	94
3.6.5.1.1.	Método cromatográfico (HPLC-UV).....	94
3.6.5.1.2.	Método global (SPE-HPLC-UV)	94
3.6.5.2.	Precisão intermédia	95
3.6.5.2.1.	Método cromatográfico (HPLC-UV).....	95
3.6.5.2.2.	Método global (SPE-HPLC-UV)	95
3.7.	Materiais de referência para o estudo da exactidão	95
3.8.	Materiais de referência utilizados no controlo de qualidade interno...	96
4.	Descrição da metodologia analítica	96
4.1.	Estudos de estabilidade da patulina	97
4.1.1.	Efeito do pH.....	97
4.1.2.	Efeito da temperatura de conservação.....	97
4.1.3.	Efeito do tempo (curva de calibração)	97
4.1.4.	Efeito das condições de evaporação	98
4.1.4.1.	Efeito da temperatura e pressão	98
4.1.4.2.	Efeito do tempo de evaporação.....	99
4.1.4.3.	Análise de uma amostra nas condições optimizadas de evaporação.....	99

4.2.	Análise cromatográfica.....	99
4.2.1.	Fundamento do método.....	99
4.2.2.	Técnica	101
4.2.2.1.	Pesagem.....	101
4.2.2.2.	Extracção	101
4.2.2.3.	Purificação do extracto por SPE	102
4.2.3.	Condições cromatográficas	102
4.3.	Condições de purificação da amostra.....	104
5.	Validação do método	105
5.1.	Selectividade/especificidade	107
5.2.	Linearidade e gama de trabalho.....	107
5.2.1.	Linearidade	107
5.2.2.	Gama de trabalho.....	108
5.3.	Limiares analíticos (LOD e LOQ)	108
5.3.1.	Método cromatográfico (HPLC-UV)	108
5.3.2.	Método global (SPE-HPLC-UV)	108
5.4.	Precisão	109
5.4.1.	Repetibilidade	109
5.4.1.1.	Método cromatográfico (HPLC-UV)	109
5.4.1.2.	Método global (SPE-HPLC-UV).....	109
5.4.2.	Precisão intermédia	110
5.4.2.1.	Método cromatográfico (HPLC-UV).....	110
5.4.2.2.	Método global (SPE-HPLC-UV).....	110
5.5.	Estudos de recuperação.....	110
5.6.	Exactidão.....	111
5.6.1.	Análise de materiais de referência.....	111
5.6.2.	Ensaio interlaboratoriais.....	111
5.7.	Limites de determinação do método global (LD).....	112
6.	Análise de amostras.....	112
6.1.	Seleção das amostras	112
6.2.	Toma de ensaio	114
6.3.	Análise de patulina pelo método de SPE-HPLC-UV.....	114
6.4.	Controlo de qualidade interno (CQI)	115
6.5.	Cálculos	115

Capítulo VI - Resultados e discussão	117
1. Estudo da estabilidade da patulina	117
1.1. Efeito do pH.....	117
1.2. Efeito da temperatura de conservação	118
1.3. Efeito do tempo (curva de calibração).....	119
1.4. Efeito das condições de evaporação (temperatura, pressão e tempo)	121
1.4.1. Efeito da temperatura e pressão.....	121
1.4.2. Efeito do tempo de evaporação	122
1.4.3. Análise de uma amostra nas condições de evaporação escolhidas	122
2. Estudos de selectividade/especificidade.....	123
3. Linearidade e gama de trabalho.....	125
3.1. Linearidade.....	125
3.2. Gama de trabalho	128
4. Limiares analíticos (LOD e LOQ)	128
4.1. Método cromatográfico (HPLC-UV)	128
4.2. Método global (SPE-HPLC-UV)	129
5. Repetibilidade e precisão intermédia	130
5.1. Método cromatográfico (HPLC-UV)	130
5.2. Método global (SPE-HPLC-UV)	131
6. Estudos de recuperação.....	132
7. Limites de determinação do método global	135
8. Exactidão.....	135
9. Controlo de qualidade interno.....	137
9.1. Análise da curva de calibração e padrões de controlo cromatográficos ..	138
9.2. Interferências de matriz.....	141
9.3. Avaliação da precisão.....	142
9.4. Avaliação da exactidão	143
10. Análise de amostras	144

Capítulo VII - Conclusões.....	149
Bibliografia e referências bibliográficas	152
Anexos.....	167
Anexo 1 - Características dos sumos e purés analisados.	168
Anexo 2 - Método dos mínimos quadrados	178
Anexo 3 - Teste das áreas normalizadas	182
Anexo 4 - Análise de resíduos.....	183
Anexo 5 - Teste de RIKILT (165).....	184
Anexo 6 - Teste de Mandel ou Teste de Fisher/Snedecor	185
Anexo 7 - Teste de homogeneidade de variâncias	187
Anexo 8 - Teores máximos de micotoxinas em alimentos	188
Anexo 9 - Procedimento de ensaio da patulina por SPE-HPLC-UV	191
Anexo 10 - Folha de cálculo: Quantificação de patulina.....	206
Anexo 11 - Folha de cálculo: Curva de calibração	207
Anexo 12 - Folha de cálculo: Áreas normalizadas.....	208
Anexo 13 - Folha de cálculo: Análise de resíduos.....	209
Anexo 14 - Folha de cálculo: Teste de RIKILT.....	210
Anexo 15 - Folha de cálculo: Teste de Mandel.....	211
Anexo 16 - Folha de cálculo: Teste de homogeneidade de variâncias	212
Anexo 17 - Folha de cálculo: Limiares analíticos (LOD e LOQ)	213
Anexo 18 - Folha de cálculo: Limite de repetibilidade e precisão intermédia	214

Índice de figuras

	Pág
Figura I.1: Estrutura química das aflatoxinas.	11
Figura I.2: Estrutura química das fumonisinas B ₁ a B ₄ .	13
Figura I.3: Estrutura química da ocratoxina A.	14
Figura I.4: Estrutura química do desoxinivalenol (DON).	15
Figura I.5: Estrutura química da zearalenona (ZEA).	16
Figura I.6: Relação entre a estrutura do ácido lisérgico e os Alcalóides do Ergot.	17
Figura II.1: Estrutura química da patulina (4-hidroxi-4H-furo[3,2c]piran-2(6H)-ona.	22
Figura II.2: Maças contaminadas com bolor azul. O <i>P.expansum</i> é um dos fungos que provoca a formação de bolor azul.	23
Figura IV.1: Etapas da técnica SPE (condicionamento, aplicação da amostra, lavagem/secagem do adsorvente e eluição).	55
Figura IV.2: (a) Cartas de controlo de Shewart, de médias ou indivíduos, em que se representa a variação no tempo de um parâmetro seleccionado, (b) carta de controlo de amplitudes, em que se monitoriza a diferença ou amplitude de valores observada para ensaios repetidos e (c) carta de controlo de somas cumulativas (em inglês “Cusum”), em que se representa o somatório de desvios observados relativamente ao valor esperado.	82
Figura V.1: Sequência do trabalho experimental para a optimização, validação e análise da patulina por SPE-HPLC-UV em sumos (límpido e turvo) e purés à base de maçã.	96

Figura V.2:	Análise da patulina por SPE-HPLC-UV em sumos (límpido e turvo) e purés à base de maçã.	100
Figura VI.1:	Variação da concentração de patulina numa solução padrão (± 2 mg/L), em função do pH da solução e do tempo de armazenamento (30 minutos e 3 semanas).	117
Figura VI.2:	Diferença de duplicados para os controlos 8 e 25 $\mu\text{g/L}$. A concentração de patulina foi calculada a partir das várias equações da recta dos padrões de calibração conservados a 4 °C.	120
Figura VI.3:	Efeito de diferentes condições de pressão de azoto e temperatura sobre a recuperação da patulina (n=5).	121
Figura VI.4:	Efeito do tempo de evaporação sobre a recuperação da patulina (40 °C e 15 psi), n=5.	122
Figura VI.5:	Cromatogramas de soluções padrão de patulina a 25 $\mu\text{g/L}$ (a), HMF (5-hidroximetilfurfural) a 50 $\mu\text{g/L}$ (b) e HMF+patulina a 50 $\mu\text{g/L}$ (c).	123
Figura VI.6:	Espectro tridimensional de um padrão de patulina a 50 $\mu\text{g/L}$ (a) e de uma amostra de sumo turvo contaminada (b) analisada por HPLC com detector de díodos.	124
Figura VI.7:	Avaliação da pureza espectral do pico de um padrão de patulina a 50 $\mu\text{g/L}$ (a) e de uma amostra de sumo turvo contaminada (b).	124
Figura VI.8:	Testes estatísticos para estudo da linearidade. Curva de calibração (a), análise de resíduos (b), áreas normalizadas (c) e teste de RIKILT (d).	127
Figura VI.9:	Resultados da participação em ensaios interlaboratoriais entre 2007 e 2009.	136
Figura VI.10:	Resultados da análise de materiais de referência FAPAS (n=3).	136

Figura VI.11:	Cartas de controlo dos parâmetros da curva de calibração: coeficiente de determinação (a), declive (b) e ordenada na origem (c), n=27.	139
Figura VI.12:	Cartas de controlo dos controlos do HPLC: 8 µg/L (a) e 25 µg/L (b), n=22.	140
Figura VI.13:	Cartas de controlo da recuperação, n=103.	141
Figura VI.14:	Carta de controlo de duplicados de amostras, n=23.	142
Figura VI.15	Cromatogramas de amostras naturalmente contaminadas. Puré (5,7 µg/kg) (a), sumo límpido (5,5 µg/kg) (b) e sumo turvo (42 µg/kg) (c).	145

Índice de tabelas

	Pág
Tabela I.1: Micotoxinas, fungos produtores e géneros alimentícios susceptíveis de contaminação.	6
Tabela II.1: Estudos de ocorrência de patulina em géneros alimentícios.	25
Tabela III.1: Teores máximos de patulina em géneros alimentícios.	40
Tabela III.2: Número mínimo de amostras elementares a colher do lote (líquidos).	42
Tabela III.3: Número mínimo de amostras elementares a colher do lote (sólidos).	43
Tabela III.4: Número de embalagens (amostras elementares) necessárias para formar a amostra global caso o lote seja constituído por embalagens individuais.	43
Tabela III.5: Critérios de desempenho para a patulina.	44
Tabela IV.1: Material adsorvente utilizado em SPE.	53
Tabela IV.2: Métodos utilizados na determinação de patulina em produtos alimentares.	63
Tabela V.1: Condições cromatográficas para a análise de patulina por HPLC-UV.	103
Tabela V.2: Programa de lavagem e de equilíbrio da coluna entre injeções de amostra.	104
Tabela V.3: Purificação das amostras por SPE.	105
Tabela V.4: Condições de evaporação no Turbovap LV.	105
Tabela V.5: Critérios de aceitação para a definição do intervalo de linearidade e da gama de trabalho.	107
Tabela V.6: Amostras agrupadas de acordo com o grupo etário e tipo de matriz.	113

Tabela VI.1:	Variação da concentração de patulina em função da temperatura de conservação expressa em termos de erro (valor percentual).	118
Tabela VI.2:	Declive, ordenada na origem e coeficiente de determinação das curvas de calibração obtidas a partir da análise dos 5 padrões de calibração conservados a 4 °C, durante 9 semanas.	119
Tabela VI.3:	Concentração média, desvio padrão relativo, máximo e mínimo dos controlos calculados com base nas equações da recta dos estudos de estabilidade da curva de calibração.	120
Tabela VI.4:	Avaliação da linearidade do método de HPLC-UV para a análise da patulina.	125
Tabela VI.5:	Limites analíticos do método de HPLC-UV.	128
Tabela VI.6:	Limites analíticos (LOD e LOQ) para as matrizes sumo límpido, sumo turvo e puré, fortificadas com 5 µg/kg de patulina (n= 10).	129
Tabela VI.7:	Teste de homogeneidade de variâncias das recuperações das matrizes sumo límpido, sumo turvo e puré, fortificadas com 5 µg/kg de patulina (n ≅ 20).	129
Tabela VI.8:	Repetibilidade e precisão intermédia do método de HPLC-UV expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR%).	130
Tabela VI.9:	Repetibilidade e precisão intermédia do método global (SPE-HPLC-UV) expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR%).	131
Tabela VI.10:	Estudos de recuperação em várias matrizes alimentares em condições de repetibilidade.	132
Tabela VI.11:	Estudos de recuperação em várias matrizes alimentares em condições de precisão intermédia.	133

Tabela VI.12:	Limite de determinação do método de SPE-HPLC-UV para a análise de patulina em sumo límpido, sumo turvo e puré.	135
Tabela VI.13:	Parâmetros das cartas de controlo referentes ao declive, ordenada na origem e coeficiente de determinação da patulina por HPLC-UV (n=27).	140
Tabela VI.14:	Parâmetros das cartas de controlo referentes aos controlos de 8 e 25 µg/L de patulina analisados por HPLC-UV (n=22).	141
Tabela VI.15:	Parâmetros das cartas de controlo referentes à recuperação da patulina (R,%) em amostras de sumo límpido, sumo turvo e puré analisados por SPE-HPLC-UV (n=103).	142
Tabela VI.16:	Critérios de aceitação de duplicados.	143
Tabela VI.17:	Avaliação da exactidão: determinação do erro relativo (E _r) para vários materiais de referência.	144
Tabela VI.18:	Concentração de patulina em sumos e purés à base de maçã comercializados em Portugal.	146
Tabela A.1a:	Características das amostras de sumos límpidos.	168
Tabela A.1b:	Características das amostras de sumos límpidos (cont).	169
Tabela A1.2a:	Características das amostras de sumos turvos.	170
Tabela A1.2b:	Características das amostras de sumos turvos (cont).	171
Tabela A1.2c:	Características das amostras de sumos turvos (cont).	172
Tabela A1.3a:	Características das amostras de purés.	173
Tabela A1.3b:	Características das amostras de purés (cont).	174
Tabela A1.3c:	Características das amostras de purés (cont).	175
Tabela A1.3d:	Características das amostras de purés (cont).	176
Tabela A1.3e:	Características das amostras de purés (cont).	177
Tabelas A8.1a	Teores máximos de micotoxinas em alimentos	188

Tabelas A8.1b	Teores máximos de micotoxinas em alimentos (cont).	189
Tabela A8.1c:	Teores máximos de micotoxinas em alimentos (cont).	190

Símbolos e abreviaturas

a	Ordenada na origem (equação da recta, $y = a + bx$)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AACC	“American Association of Cereal Chemists”, Associação Americana de Químicos de Cereais
AOAC	“Association of Official Analytical Chemists”, Associação Oficial de Químicos Analíticos
AOCS	“American Oil Chemists Society”, Sociedade Americana de Químicos de Óleos
A_{100}	Área do pico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação
A_{max}	Absorvência da solução de patulina no comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvência (≈ 276 nm)
A_i	Área do pico correspondente a uma determinada concentração
a_w	Actividade da água
b	Declive da recta (equação da recta $y = a + bx$)
Bipea	“Bureau InterProfessionnel d’Etude Analytique”
C	Concentração (m/v)
CC	Cartas de controlo
C_{100}	Concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação
C_a	Concentração de patulina na amostra fortificada, determinada experimentalmente ($\mu\text{g/kg}$)
CE	Comunidade Europeia
C_t	Concentração teórica de patulina na amostra fortificada ($\mu\text{g/kg}$)
C_i	Concentração correspondente à área A_i
C_p	Concentração de patulina no padrão de calibração ($\mu\text{g/L}$) correspondente ao padrão de menor concentração

CEN	“European Committee for Standardization”, Comité Europeu de Normalização
Conc	Concentração
CV	Coeficiente de variação (o mesmo que desvio padrão relativo)
CV_m	Coeficiente de variação do método
CV_r	Coeficiente de variação de repetibilidade
CV_R	Coeficiente de variação de reprodutibilidade
DAN	Departamento de Alimentação e Nutrição
DD%	Diferença de duplicados
DL ₅₀	Dose letal 50
DON	Desoxinivalenol
DP	Desvio padrão (igual a S)
DPR%	Desvio padrão relativo
DPR _r	Desvio padrão relativo da repetibilidade
DPR _R	Desvio padrão relativo da reprodutibilidade
DS ²	Diferença de variâncias (estudo de funções lineares)
ε	Coeficiente de absorção molecular para a solução de patulina a 276 nm
EFSA	“European Food Safety Authority”, Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
Emb	Embalagem
E_r	Erro relativo
F	Valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher
F_C	Factor de concentração
FAO	“Food and Agriculture Organization”, Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FAPAS	“Food Analysis Performance Assessment Scheme”
FDA	“Food and Drug Administration”, Agência Americana de Controlo da Qualidade de Produtos Alimentares e Farmacêuticos

FSIS	“Food Standard Agency”
δ	Percurso óptico da célula (cm)
GC	“Gas Chromatography”, cromatografia em fase gasosa
GC-ECD	“Gas Chromatography with Electronic Capture Detector”, cromatografia em fase gasosa com detector de captura electrónica
GC-FID	“Gas Chromatography with Flame Ionization Detector”, cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama
GC-MS	“Gas Chromatography- Mass Spectrometry”, cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa
HACCP	“Hazard Analysis and Critical Control Points”, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo
HLB	“Hydrophilic-Lipophilic-Balance”, balanço hidrofílico-lipofílico
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”, cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	“High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector”, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de díodos
HPLC-FL	“High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector”, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência
HPLC-UV	“High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector”, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta
IAC	“Immunoaffinity column”, coluna de imunoafinidade.
IARC	“International Agency for Research on Cancer”, Agência Internacional de Investigação em Cancro
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IUPAC	“International Union of Pure and Applied Chemistry”, União Internacional de Química Pura e Aplicada
ISO	“International Standard Organization”, Organização Internacional de Normalização
JECFA	“FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives of the United Nations” Comissão conjunta de peritos em aditivos alimentares da FAO/OMS
LC	“Liquid Chromatography”, cromatografia líquida

LC-MS	“Liquid Chromatography - Mass Spectrometry”, cromatografia líquida de alta eficiência - espectrometria de massa
LC-MS/MS	“Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (tandem)”, cromatografia líquida de alta eficiência - espectrometria de massa “tandem”
LD	“Limit of Determination”, limite de determinação
LLE	“Liquid-Liquid Extraction”, extracção líquido-líquido
LOD	“Limit of Detection”, limite de detecção
LOQ	“Limit of Quantification”, limite de quantificação
MAFF	“Ministry of Agriculture, Fisheries and Food”, Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentos
Max	Máxima
MEKC	“Micellar Electrokinetic Chromatography”, cromatografia electrocinética micelar
MRC	Material de Referência Certificado
MSPD	“Matrix Solid Phase Dispersion”, dispersão em fase sólida
<i>n</i>	Número de ensaios ou número de amostras analisadas
<i>N</i>	Número de pontos experimentais da recta de calibração
NOAEL	“No-Observed-Adverse-Effect-Level”, nível de ausência de efeitos adversos ou nível de efeitos adversos não observados
NOEL	“No-Observed-Effect-Level”, nível de ausência de efeitos ou nível de efeitos não observados
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTA	Ocratoxina A
<i>p.a.</i>	Pró-análise
PM	Peso molecular
PMTDI	“Provisional maximum tolerable daily intake” dose diária admissível máxima provisória
PTDI	“Provisional Tolerable Daily Intake”, dose diária admissível provisória
PTWI	“Provisional Tolerable Weekly Intake”, dose semanal admissível provisória

r	Repetibilidade
R	Coeficiente de correlação da recta
R^2	Coeficiente de determinação da recta
$R (\%)$	Percentagem de recuperação
R_{prod}	Reprodutibilidade
Ref	Referência
RIVM	“National Institute for Public Health and the Environment”
S	Unidade de desvio ou desvio padrão (igual a DP)
S^2	Variância
S_a	Desvio padrão da ordenada na origem(a)
S_b	Desvio padrão do declive da recta (b)
S_m	Desvio padrão do método
S_r	Desvio padrão calculado a partir dos resultados obtidos em condições de repetibilidade
S_R	Desvio padrão calculado a partir dos resultados obtidos em condições de reprodutibilidade
S_{xo}	Desvio padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com a concentração mais baixa da gama de trabalho
Sx_{lab}	Desvio padrão associado à média dos valores do laboratório (x_{lab})
$S_{y/x}$	Desvio padrão residual de uma função linear
S_{y2}	Desvio padrão residual de uma função polinomial
S^2_{y2}	Variância de uma função polinomial
$S^2_{y/x}$	Variância de uma função linear
SCF	“Scientific Committe for Food”, Comité Científico Alimentar
SCOOP	“Scientific Cooperation on Questions Relating to Food”,Cooperação científica sobre questões relacionadas com alimentos
SPE	“Solid Phase Extraction”, extracção em fase sólida
SPLIN	Solução padrão para estudo da linearidade
t	Valor da variável de <i>Student</i>

t_{tab}	Valor tabelado de t de <i>Student</i>
TLC	“Thin Layer Chromatography”, cromatografia em camada fina
TDI	“Tolerable Daily Intake”, dose diária admissível
t_R	Tempo de retenção
v_n	Nº de graus de liberdade
VT	Valor teste
WHO	“World Health Organisation”, Organização Mundial de Saúde
x_i	Concentração de cada um (i) dos N padrões de calibração
x_{lab}	Média dos valores experimentais obtidos pelo laboratório na análise do MRC
x_m	Valor médio do parâmetro de qualidade utilizado na construção das cartas de controlo
x_v	Valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor do certificado do MRC
\bar{x}	Valor médio de concentração
y'	Área estimada, com base na equação da recta
\bar{y}	Média de valores de y_i (sinal instrumental)
y_i	Valores individuais de sinal instrumental
\bar{y}_i	Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração
\bar{y}_{i2}	Sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração
Z	“Z-score”, factor de desempenho
ZEA	Zearalenona

Introdução

Os fungos e os seres humanos têm estabelecido ao longo de séculos uma relação de amor-ódio ou, por outras palavras, de benefício *versus* toxicidade. Se por um lado o Homem tem utilizado desde há muitos anos, em seu proveito, a capacidade de certos fungos para produzir substâncias farmacologicamente activas, os antibióticos, também é certo que alguns fungos são capazes de produzir metabolitos que são tóxicos para as células de mamíferos, as micotoxinas. Estes compostos são metabolitos secundários produzidos por diversos fungos, os quais podem contaminar uma vasta gama de produtos alimentares, particularmente cereais, em determinadas condições favoráveis. A ingestão de alimentos fortemente contaminados com micotoxinas pode provocar problemas graves de saúde resultantes da exposição aguda a estes compostos, podendo nalguns casos conduzir à morte. A exposição prolongada a níveis reduzidos de micotoxinas pode ser também bastante nociva uma vez que alguns destes compostos possuem propriedades imunossupressoras, estrogénicas, mutagénicas e carcinogénicas. Várias micotoxinas foram classificadas pela Agência Internacional para a Investigação em Cancro (IARC) como carcinogénicos ou potenciais carcinogénicos para o Homem (1).

Além dos efeitos nocivos para a saúde, o impacto económico das micotoxinas é relevante devido aos elevados prejuízos que causam a nível pecuário (incluindo mortalidade e diminuição da produtividade) e agrícola, devido à impossibilidade de comercializar culturas cerealíferas e outros produtos alimentares que apresentem níveis inaceitáveis de contaminação com micotoxinas.

Existem actualmente várias micotoxinas que podem ser causa de doença e mesmo de morte, especialmente em zonas tropicais e subtropicais de países subdesenvolvidos. É portanto essencial saber quais são as micotoxinas que contaminam os géneros alimentícios, os seus níveis de contaminação e a frequência da sua ocorrência (2). Têm sido publicados ao longo dos últimos anos vários estudos sobre ocorrência e níveis de contaminação de micotoxinas em alimentos e, neste contexto, considera-se que, de entre as várias toxinas já descobertas, apenas algumas são importantes em termos económicos e toxicológicos. Neste grupo incluem-se as aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, fumonisinas, desoxinivalenol (tricotecenos) e zearalenona (2).

A patulina é uma micotoxina produzida por certas espécies de *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* e *Byssoschlamys sp.* e pode contaminar diversos alimentos, em particular a maçã. Quando se usa fruta deteriorada na preparação de sumos ou purés (fabrico industrial), o produto final pode apresentar patulina devido à contaminação pelas zonas

deterioradas da fruta com o fungo e respectiva micotoxina. Estes alimentos constituem portanto as principais fontes de exposição humana à patulina (3-6).

Diversos estudos de toxicidade mostram que a patulina é genotóxica, mutagénica, imunossupressora e neurotóxica, mas os estudos de carcinogenicidade não foram conclusivos e por essa razão a patulina foi classificada no grupo 3 da IARC onde se incluem os compostos para os quais não existem evidências de carcinogenicidade para humanos (7).

O grupo etário dos lactentes e crianças jovens é considerado um grupo particularmente vulnerável, mais exposto à contaminação com patulina devido ao seu baixo peso e elevado consumo de produtos à base de maçã. Existem alguns estudos publicados nos últimos anos que indicam que a exposição das crianças a esta micotoxina através do consumo de alimentos à base de maçã atinge ou excede a dose diária admissível máxima provisória, PMTDI (“provisional maximum tolerable daily intake”) durante a infância (8).

Com o objectivo de proteger a saúde das crianças, a Comissão Europeia estabeleceu limites máximos para certos contaminantes presentes em produtos destinados à alimentação infantil. O Regulamento (CE) nº 1881/2006 estabeleceu teores máximos de 10 µg/kg para a patulina em alimentos destinados a lactentes e crianças jovens (9).

De forma a avaliar a exposição das crianças à patulina é necessário dispor de um método de análise validado e com um limiar analítico suficientemente baixo para detectar e quantificar a patulina em produtos à base de maçã destinados à alimentação infantil.

Com o presente trabalho pretendeu-se otimizar e validar um método analítico adequado para o estudo da ocorrência de patulina em produtos à base de maçã comercializados em Portugal, particularmente em alimentos destinados a lactentes e crianças jovens. Deste modo foram estabelecidos os seguintes objectivos:

- Avaliação da estabilidade da patulina.
- Optimização e validação de um método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (HPLC-UV), precedida de extracção em fase sólida (SPE).
- Elaboração e implementação de um procedimento técnico para a análise da patulina e avaliação do mesmo nas análises de rotina.
- Elaboração e validação das folhas de cálculo inerentes ao processo de validação do método e ao procedimento técnico (avaliação dos níveis de contaminação do

género alimentício), as quais, permitirão ao laboratório a acreditação do respectivo parâmetro analítico, “Análise da patulina por SPE-HPLC-UV”.

- Avaliação dos níveis de contaminação dos géneros alimentícios disponíveis no mercado português, incluindo não só purés e sumos à base de maçã, particularmente os destinados à alimentação infantil, mas também os sumos de maçã destinados aos consumidores em geral.
- Comparação dos teores de patulina presentes nas diferentes matrizes (sumo límpido, sumo turvo e puré).
- Comparação dos níveis de contaminação dos alimentos convencionais com os dos alimentos de origem biológica.

O presente trabalho foi organizado em capítulos, onde se descrevem os fundamentos teóricos, as metodologias, o desenvolvimento experimental, os resultados e respectiva discussão e as conclusões associados à determinação de patulina em alimentos à base de maçã.

O capítulo I apresenta de forma resumida, a estrutura química, as vias de exposição, a ocorrência e a toxicidade de algumas das micotoxinas ou grupos de micotoxinas, consideradas mais importantes devido à gravidade dos efeitos tóxicos ou devido à frequência de ocorrência nos alimentos.

O capítulo II é dedicado à patulina. Este capítulo inicia-se com um resumo da história desta micotoxina e com a sua caracterização química, abordando-se, em particular, alguns aspectos associados à sua ocorrência e toxicidade.

O capítulo III apresenta os aspectos legislativos relevantes na pesquisa de patulina em alimentos.

O capítulo IV apresenta os fundamentos teóricos inerentes aos métodos analíticos para a análise de micotoxinas em géneros alimentícios, em particular os referentes à análise da patulina. Neste capítulo faz-se uma abordagem geral sobre a amostragem, os métodos de preparação de amostra e as metodologias mais utilizadas na análise das várias micotoxinas, descrevendo-se mais pormenorizadamente os métodos analíticos usados na análise de patulina em géneros alimentícios e os parâmetros de qualidade utilizados na validação de métodos de ensaio.

No capítulo V é descrita a metodologia seguida no desenvolvimento experimental do trabalho, incluindo equipamento, material, reagentes e preparação de soluções, metodologias utilizadas nos estudos de estabilidade, optimização e validação do método e na determinação da patulina em sumos e purés à base de maçã. Neste capítulo referem-se ainda as condições cromatográficas e descrevem-se os ensaios efectuados.

O capítulo VI apresenta e discute os resultados obtidos nos ensaios de estabilidade, nos ensaios de validação e na análise das amostras estudadas.

O capítulo VII apresenta as principais conclusões do trabalho realizado.

Capítulo I - Micotoxinas

1. Generalidades

Os fungos são capazes de produzir em condições naturais e laboratoriais, metabolitos secundários tóxicos. Os metabolitos secundários são compostos biossintetizados e excretados através de um conjunto de vias metabólicas (que constituem o metabolismo secundário), mas que não são essenciais para o crescimento e sobrevivência do organismo. Estes compostos estão presentes no meio de cultura ou substrato onde os fungos se encontram a crescer. Alguns metabolitos secundários fúngicos têm propriedades antibióticas, e alguns demonstram toxicidade para os animais. Os metabolitos secundários produzidos por fungos filamentosos que demonstram propriedades tóxicas em animais são designados genericamente por micotoxinas. A palavra micotoxina tem origem no termo grego “mycos” que significa fungo e no termo latino “toxicum” que significa veneno (10).

As micotoxinas são contaminantes naturais de baixo peso molecular que podem contaminar uma grande diversidade de produtos alimentares incluindo cereais, amendoins e frutos, antes e após a colheita, e podem desenvolver-se numa vasta gama de condições climatéricas (10-13).

A sua presença nos alimentos é generalizada, estimando-se que cerca de 25% das culturas agrícolas em termos mundiais estejam contaminadas com micotoxinas (13).

Até à data já foram identificadas cerca de 200 espécies diferentes de fungos filamentosos e descobertas algumas centenas de micotoxinas, exibindo grande diversidade estrutural, da qual resulta uma grande variedade de propriedades físicas e químicas. A maioria das micotoxinas é quimicamente estável, resistindo aos métodos de processamento habitualmente utilizados na indústria alimentar (14).

Além de ser um problema de segurança alimentar, a contaminação de alimentos com micotoxinas é essencialmente um problema de saúde pública, dado que estes compostos podem provocar efeitos graves na saúde humana e animal.

Neste contexto, as micotoxinas mais importantes são, em geral, produzidas por fungos pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, e incluem aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, alcalóides do Ergot e patulina (12).

Na tabela I.1 apresentam-se as micotoxinas mais importantes de cada grupo, os principais fungos produtores e os géneros alimentícios mais susceptíveis de contaminação.

Tabela I.1: Micotoxinas, fungos produtores e géneros alimentícios susceptíveis de contaminação [Adaptado de (11)].

Micotoxina	Fungo produtor	Género alimentício
Aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Milho, trigo, arroz, sorgo, amendoim, nozes, figos
Aflatoxina M ₁	a)	Leite e derivados
Fumonisinias B ₁ , B ₂ e B ₃	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Milho e derivados, sorgo, espargos
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Cereais, passas de uva, vinho, café
Tricotecenos (Desoxinivalenol)	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Cereais e derivados
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Cereais e derivados
Alcalóides do Ergot	<i>Claviceps purpurea</i>	Centeio
Patulina	<i>Penicillium expansum</i>	Maças, peras e produtos derivados

a) Metabolito da aflatoxina B1 em mamíferos

Os fungos possuem diversas formas de provocar doenças no Homem. Uma delas é através do seu desenvolvimento num hospedeiro animal, provocando um conjunto de doenças genericamente designadas por micoses. Existem ainda doenças, também de etiologia fúngica, que estão associadas às micotoxinas produzidas por espécies saprófitas de fungos e que também podem constituir um perigo para a saúde humana (13). A exposição, por via alimentar, respiratória, dérmica ou outra, a estes compostos (micotoxinas), provoca um conjunto de doenças genericamente designadas por micotoxicoses (13).

As micotoxicoses, tal como outras síndromes toxicológicas, podem ser classificadas em agudas e crónicas. A toxicidade aguda tem geralmente um aparecimento rápido e uma

resposta tóxica característica, estando associada à presença de níveis elevados de micotoxinas em alimentos. A toxicidade crónica caracteriza-se por exposição a doses reduzidas de toxina durante um longo período de tempo, podendo daí resultar doenças como cancro ou outros efeitos graves para a saúde (15).

De um modo geral, quando existe a possibilidade de ocorrer a exposição crónica a um contaminante alimentar, a FDA (“Food and Drug Administration”) determina o nível de exposição que garanta a existência de uma margem de segurança adequada, relativamente à ocorrência de efeitos adversos conhecidos. Esses níveis de exposição são habitualmente obtidos a partir de estudos efectuados em animais em que se determina a dose mais elevada que não produz efeitos adversos. Este nível designa-se como NOAEL (“No-Observed-Adverse-Effect-Level”). Este valor é multiplicado por um factor de segurança de 100 correspondente a dois factores de 10, um dos factores está relacionado com a extrapolação dos dados dos animais para o Homem (variação inter-espécie) e o outro com a variação de sensibilidade dos seres humanos ao efeito do contaminante (variação intra-espécie). Este cálculo conduz ao valor da dose diária admissível provisória, PTDI (“Provisional Tolerable Daily Intake”) ou ao valor da dose semanal admissível provisória, PTWI (“Provisional Tolerable Weekly Intake”). Estas doses correspondem a valores limite de ingestão diária ou semanal e são expressas como o número de miligramas do composto por quilograma de peso corporal que podem ser consumidos pelo indivíduo, por dia ou semana, durante toda a vida, sem apresentarem, à luz dos conhecimentos actuais, riscos apreciáveis para o Homem (16-21).

A exposição às micotoxinas ocorre com maior frequência em zonas do globo menos desenvolvidas onde o manuseamento e o armazenamento dos alimentos se processam em condições deficitárias, onde existem problemas de subnutrição e onde os regulamentos para proteger a saúde das populações não existem ou não são aplicados de forma eficaz.

Nos países desenvolvidos a existência de alimentos em quantidade suficiente e a existência de legislação que controla os níveis de toxinas presentes nos alimentos permitem proteger as populações da exposição a quantidades significativas de micotoxinas. No entanto, certos grupos populacionais podem ser mais vulneráveis à exposição às micotoxinas. Os lactentes e as crianças jovens são mais susceptíveis às toxinas do que os adultos, devido ao menor peso corporal, maior taxa metabólica, menor capacidade de desintoxicação e devido ao desenvolvimento incompleto de alguns órgãos e tecidos, tal como o sistema nervoso central (22). Etzel (2006) (23) reforça a importância das síndromes associadas à exposição de crianças a micotoxinas, com impacte crescente em países em vias de desenvolvimento, considerando-as como uma

das doenças do século XXI. Antes consideradas como problemáticas em países africanos e asiáticos, recentemente têm sido referenciado um número crescente de intoxicações provocadas por micotoxinas em países desenvolvidos como os Estados Unidos da América.

As doenças associadas a micotoxinas são conhecidas como “Great Masquerader” ou doença mascarada do século XXI devido ao facto de o conjunto de sinais e sintomas envolvidos nas diferentes fases da doença serem pouco específicos e poderem ser facilmente confundidos com os de outras doenças (23). Estas doenças podem apresentar uma variedade de sintomas e sinais clínicos inespecíficos, tais como erupção cutânea, conjuntivite, epistaxe, apneia, tosse, sibilos, náuseas e vômitos. Alguns casos de vômitos, insuficiência da medula óssea, hemorragia pulmonar aguda e apneia recorrente e/ou “pneumonia” estão associados à exposição às micotoxinas. A familiarização do clínico com os sintomas da exposição às principais classes de micotoxinas permite-lhe efectuar perguntas pertinentes sobre a possibilidade de exposição às micotoxinas e, deste modo, retirar a criança da fonte de exposição, nomeadamente, do(s) alimento(s) contaminado(s), do vestuário e móveis, ou do ar ambiente da casa. A incapacidade de evitar a repetição à exposição resulta frequentemente na recorrência da doença. Encontram-se ainda documentados outros efeitos associados ao consumo de alimentos contaminados com micotoxinas, incluindo, cancro hepático, cancro esofágico e defeitos do tubo neural. A consciencialização a curto e longo prazo dos riscos associados a estas toxinas naturais ajudará os pediatras a actuarem na protecção e defesa da saúde infantil (23).

O conhecimento e avaliação do grau de exposição humana às micotoxinas são fundamentais no âmbito da protecção da saúde pública. A avaliação do grau de exposição individual pode ser efectuada recorrendo a métodos de biomonitorização utilizando marcadores específicos, presentes em diferentes fluidos biológicos como urina, sangue e leite. Com o conhecimento destes parâmetros pode ser efectuada uma estimativa do risco de desenvolvimento de certas patologias (23).

2. Vias de exposição

A principal via de exposição às micotoxinas é a via alimentar através do consumo de alimentos contaminados. Existem, no entanto, outras vias de exposição relativamente importantes incluindo a inalação de esporos e a via dérmica (24).

Relativamente à exposição por via inalatória existem evidências que implicam o fungo *Stachybotrys chartarum* em micoses, particularmente, na “síndrome do edifício doente”. Entre 1992 e 1993 ocorreu um surto de hemorragia pulmonar aguda em crianças nos Estados Unidos da América tendo-se verificado a presença de *S. chartarum* no pó e nas superfícies das habitações das crianças doentes. Este fungo desenvolve-se especialmente em casas com muita humidade e presume-se que a inalação de esporos de *S. chartarum* tenha sido a causa desta doença (15, 25).

A exposição por via dérmica também pode ser uma via de exposição importante, podendo causar efeitos nocivos para a saúde, em particular, para os trabalhadores da indústria alimentar durante o manuseamento de géneros alimentícios contaminados com micotoxinas. Refere-se, como exemplo, a exposição dérmica resultante do manuseamento de maçãs contaminadas com patulina durante as fases de pré e pós colheita, cujos efeitos genotóxicos a nível da pele foram avaliados recentemente num estudo em pele de rato (26).

Há ainda a considerar a exposição simultânea a várias micotoxinas e os eventuais efeitos tóxicos combinados daí resultantes. Diversos géneros alimentícios podem conter misturas de micotoxinas, produzidas pela mesma espécie ou por espécies de fungos diferentes. A presença de várias micotoxinas no mesmo alimento conduz a uma ingestão combinada que poderá ter consequências mais graves para a saúde do que o consumo de cada uma das toxinas individualmente. A informação toxicológica e epidemiológica dos efeitos da exposição simultânea a várias micotoxinas é ainda bastante limitada. Em termos de avaliação de risco para os seres humanos expostos a várias micotoxinas é importante saber quais as combinações de micotoxinas que apresentam efeitos aditivos ou as que apresentam sinergismo. Nestes casos presume-se que o efeito tóxico combinado resultante será mais grave para a saúde. Algumas das combinações referidas na literatura incluem a ocratoxina A e citrinina, as misturas de tricotecenos (27) e a fumonisina B₁ com a ocratoxina A (28). São necessários mais estudos nesta área, no sentido de conseguir prever os efeitos tóxicos das combinações de micotoxinas naturalmente presentes nos alimentos. No entanto, se a dieta humana for diversificada, o nível de exposição será mais reduzido e descontinuado, o que de certa forma poderá atenuar o seu efeito final.

3. Ocorrência e toxicidade das principais micotoxinas

Nesta secção irá ser efectuada uma descrição individual sobre as principais micotoxinas no que se refere à ocorrência, caracterização química, toxicidade e efeitos na saúde. A patulina, em virtude de ser a micotoxina em estudo, terá uma abordagem mais detalhada e será apresentada num capítulo independente.

3.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas são micotoxinas derivadas das difuranocumarinas produzidas principalmente por algumas estirpes de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (10, 13). Podem estar presentes em diversos alimentos incluindo amendoins, frutos de casca rija, frutos secos e cereais (em particular milho) e especiarias. Alguns dos alimentos referidos são muito utilizados na confecção de produtos destinados à alimentação infantil (caso dos cereais e frutos de casca rija).

De entre as 20 aflatoxinas já identificadas apenas quatro são consideradas importantes devido à elevada frequência com que são detectadas em diversos produtos alimentares. Estas micotoxinas designam-se por aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂ e a sua nomenclatura foi estabelecida com base na sua fluorescência sob luz ultravioleta (azul ou verde) e com base na sua mobilidade relativa em cromatografia em camada fina (13). Existem ainda as aflatoxinas M₁ e M₂ que são os metabolitos principais das aflatoxinas B₁ e B₂, respectivamente, detectados no leite. Na figura I.1 encontram-se representadas as estruturas químicas destas seis aflatoxinas.

As aflatoxinas são um grupo importante a considerar, na medida em que estão muitas vezes associadas à ocorrência de efeitos nocivos graves na saúde humana e animal.

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas podem ser provocados por intoxicações agudas ou podem ser resultantes da exposição prolongada a estes contaminantes. O fígado é o principal órgão alvo das aflatoxinas.

A primeira micotoxicose relacionada com a intoxicação de animais ocorreu em 1960, em Londres, tendo-se registado a morte de cerca de 100.000 jovens perús após o consumo de rações contaminadas (amendoim proveniente do Brasil) com um metabolito tóxico produzido por um fungo, *Aspergillus flavus*. A micotoxina foi isolada e identificada como aflatoxina. O nome da doença (doença X do Perú) resultou do desconhecimento da sua origem. Este incidente ilustrou bem o potencial tóxico das micotoxinas e levou a um aumento significativo dos trabalhos de investigação desenvolvidos nesta área, os quais, têm vindo a aumentar até à actualidade. Vários casos de micotoxicoses agudas em

animais foram posteriormente descritos em galinhas, porcos, veados e outros animais, associados a patologias como hepatites, hemorragias e nefropatias (29).

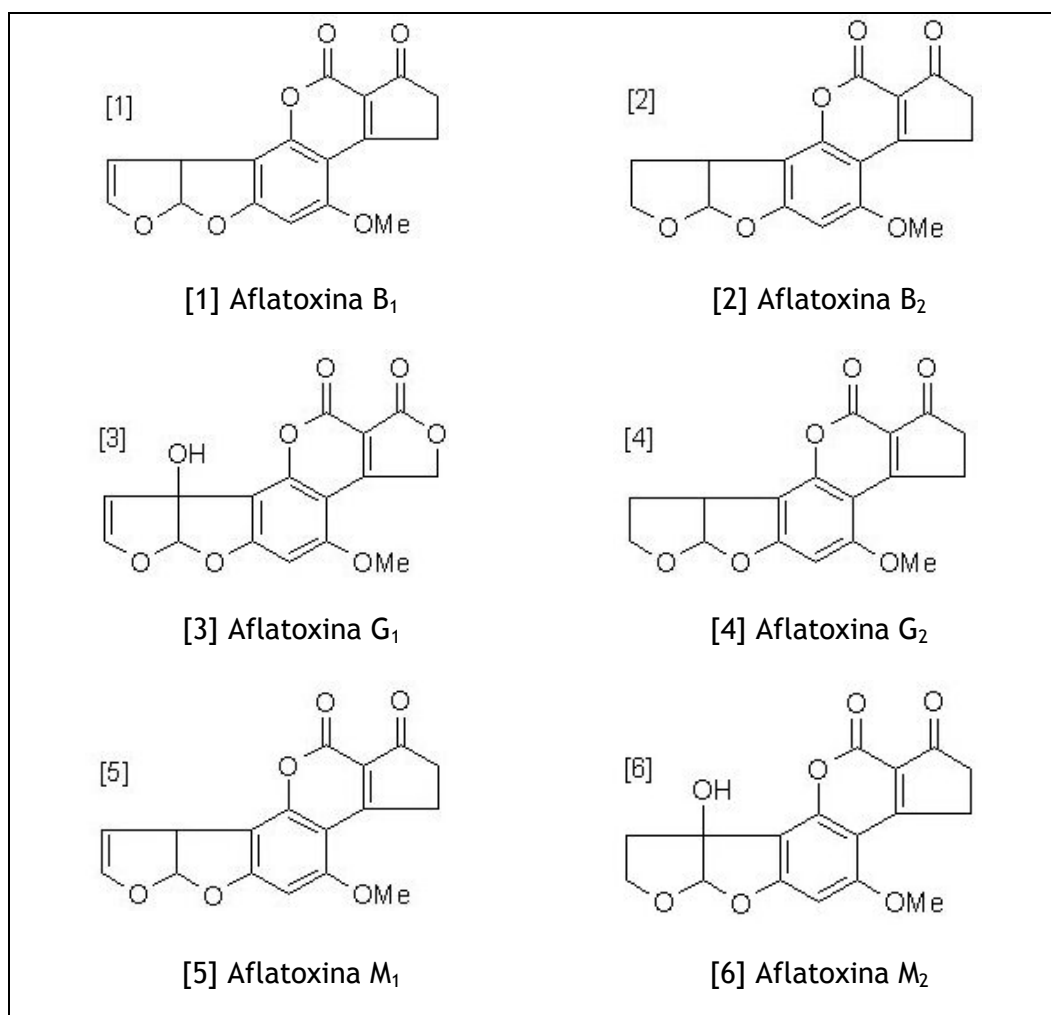


Figura I.1: Estrutura química das aflatoxinas.

As intoxicações agudas provocadas pelas aflatoxinas podem causar morte. Têm sido registados surtos de aflatoxicoses em humanos em diferentes partes do mundo. Um deles ocorreu em 1974, na Índia (15). Foram afectadas 397 pessoas, tendo-se registado a morte de cerca de 100 indivíduos. O milho, componente maioritário da dieta, terá sido a principal fonte de contaminação. Um outro caso mais recente ocorreu em 2004 no Quênia, tendo-se registado 317 casos e 125 mortes. Uma percentagem considerável dos casos ocorridos dizia respeito a crianças com idade inferior a 5 anos (cerca de 20%) (30).

Diversos estudos toxicológicos atribuem às aflatoxinas efeitos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos e imunossupressores (24). A aflatoxina B₁ é o carcinogénico

de origem natural mais potente que se conhece, sendo na maioria dos casos, a principal aflatoxina formada pelas estirpes produtoras. De acordo com a classificação da IARC as aflatoxinas B₁ pertencem ao Grupo I, ou seja, o dos compostos carcinogénicos para o Homem e as aflatoxinas M₁, B₂, G₁, G₂ foram classificadas no grupo 2B, isto é, compostos possivelmente carcinogénicos para o Homem (1, 31).

A exposição alimentar à aflatoxina B₁ é considerado um factor de risco importante para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular primário no Homem, particularmente em indivíduos com hepatite B (13). Alguns estudos evidenciam a existência de sinergismo entre o vírus da hepatite B e a aflatoxina B₁. Sabe-se que em populações infectadas com o vírus da hepatite B ou C a exposição à aflatoxina aumenta em cerca de 30 vezes o risco de ocorrência de cancro hepático (15).

O Comité Científico Alimentar, SCF (“Scientific Committee for Food”) emitiu um parecer em 1994 no qual refere que as aflatoxinas são carcinogénicos genotóxicos. Para as substâncias deste tipo, não existe limiar abaixo do qual não se observa efeitos nocivos, não sendo por isso possível estabelecer dose diária admissível, TDI (“Tolerable Daily Intake”) (32).

3.2. Fumonisinias

As fumonisinias são micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* (anteriormente *F. molliniforme*) e *Fusarium proliferatum* (33).

As fumonisinias são contaminantes habituais do milho e encontram-se disseminadas um pouco por todo o mundo (34).

Existem pelo menos 15 fumonisinias diferentes sendo o grupo principal constituído pelas fumonisinias B, de onde se destaca pelos seus efeitos tóxicos, a fumonisina B₁ que é também a mais frequente em produtos alimentares (34). Na figura I.2 encontram-se representadas as estruturas das fumonisinias B₁, B₂, B₃ e B₄.

Os efeitos tóxicos das fumonisinias em animais incluem leucoencefalomalácia em cavalos, edema pulmonar em suínos, toxicidade renal em ovelhas, ratos e coelhos e hepatotoxicidade em ratos (35). Nos humanos existem relatos de casos de possível exposição aguda às fumonisinias. Em 1977 na Índia, a exposição a níveis elevados de fumonisinias presentes em milho bolorento esteve associada a um surto de doença de origem alimentar, caracterizada essencialmente por distúrbios gastrointestinais (15). Por outro lado, suspeita-se que as fumonisinias estejam associadas à ocorrência de cancro esofágico no Homem, particularmente para níveis elevados de exposição.

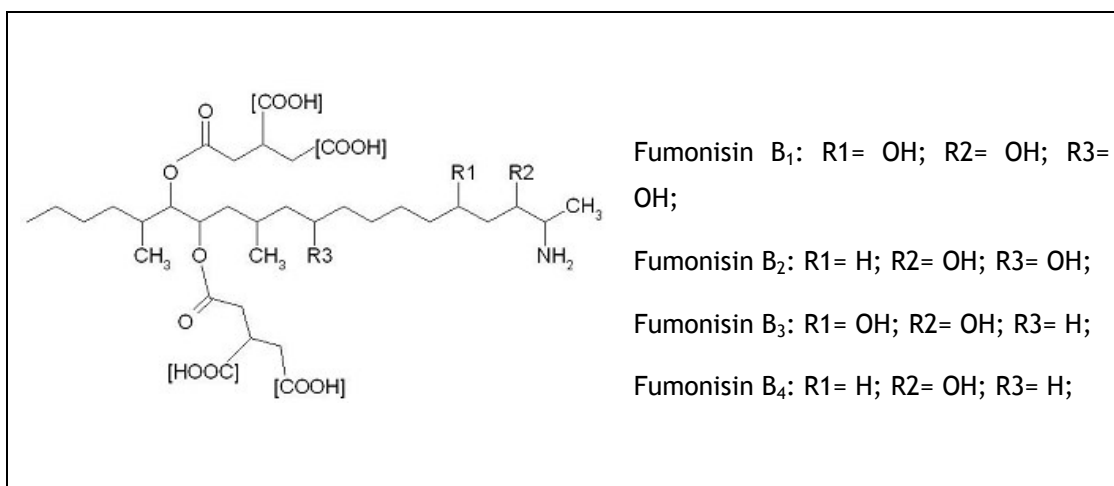


Figura I.2: Estrutura química das fumonisinas B₁ a B₄.

Estudos realizados na África do Sul demonstraram a associação entre a elevada incidência de cancro do esófago no Homem e a existência de elevados níveis de contaminação por fumonisinas em milho (15). A fumonisina B₁ também reduz a absorção de folato em culturas celulares e por este motivo, pode provocar defeitos no tubo neural de animais de laboratório. Consequentemente, poderá ter o mesmo efeito no Homem, estando associada à ocorrência de defeitos do tubo neural em bebés (33). A IARC classificou a FB₁ como possivelmente carcinogénica para o homem, incluindo-a no grupo 2B (31).

A JECFA (“Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives”) considera que a nefrotoxicidade é o efeito mais marcante da fumonisina B₁. Com base em estudos de toxicidade de longo termo em roedores, a JECFA fixou um valor de dose diária admissível máxima provisória (PMTDI) de 2 µg/kg de peso corporal por dia para as fumonisinas B₁, B₂ e B₃, isoladas ou combinadas, com base num NOEL de 0,2 mg/kg de peso corporal/dia estabelecido para a toxicidade renal (36).

3.3. Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por diversas espécies de *Aspergillus* e de *Penicillium*, incluindo *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* (10, 24) em climas semitropicais e temperados (34).

É uma micotoxina que se encontra presente em produtos alimentares um pouco por todo o mundo e contamina habitualmente cereais (cevada, trigo, milho, aveia) e

derivados, café e vinho (24), podendo também estar presente em uvas, chocolate, cacau, cerveja, carne de porco, leite e derivados (37), especiarias e frutos secos (Turner, 2009). A presença de OTA em vinhos constitui uma preocupação recente, particularmente os vinhos tintos, uma vez que apresentam, de um modo geral, níveis mais elevados de OTA comparativamente aos vinhos rosé e branco (38). Na figura I.3 encontra-se representada a estrutura da ocratoxina A.

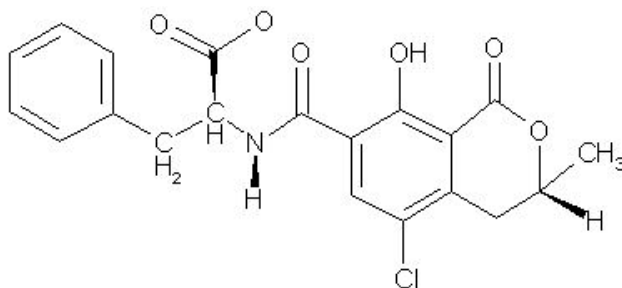


Figura I.3: Estrutura química da ocratoxina A.

A OTA faz parte de um grupo de pelo menos nove ocratoxinas e é considerada a mais importante em termos toxicológicos. É estável, possuindo um tempo de semivida longo, o que significa que se mantém presente no organismo durante bastante tempo. Nos humanos, a OTA é metabolizada de forma muito lenta, possuindo um tempo de semivida superior a 30 dias e acumula-se principalmente nos rins e fígado (34).

Nos animais, a ingestão de rações contaminadas leva à acumulação de OTA no músculo e tecido adiposo. A exposição humana ocorre em resultado do consumo de carne contaminada.

Os efeitos tóxicos da OTA incluem nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, imunossupressão e teratogenicidade (10, 34). A OTA tem sido apontada como a causa da Nefropatia Endémica dos Balcãs (BEM, “Balkan Endemic Nephropathy”), uma doença renal crónica que pode ser fatal para o Homem (15). Foi ainda referenciada como suspeita de promover o desenvolvimento de cancro testicular em indivíduos expostos à OTA, quer na fase gestacional quer nos primeiros anos de vida (23).

A OTA foi classificada pela IARC no Grupo 2B (1). A JECFA estabeleceu uma PTWI de 100 ng/kg de peso corporal, que corresponde aproximadamente a 14 ng/kg de peso corporal por dia (39). Recentemente a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, EFSA (“European Food Safety Authority”), propôs um novo valor de PTWI de 120 ng/kg de

peso corporal, que corresponde a aproximadamente 17,1 ng/kg de peso corporal por dia (40).

3.4. Tricotecenos

Os tricotecenos são um grupo de metabolitos secundários aparentados, produzidos essencialmente por fungos do género *Fusarium*, de onde se destacam as espécies *F. graminearum* e *F. culmorum* como principais produtores (2).

Os tricotecenos constituem uma família de mais de 60 metabolitos sesquiterpenoides, divididos em quatro grupos: A, B, C e D. Um dos tricotecenos mais estudado é o desoxinivalenol (DON) devido à sua elevada toxicidade e ocorrência frequente em alimentos, embora sejam também detectados outros tricotecenos tais como nivalenol, toxina T-2, diacetoxiscirpenol e menos frequentemente a fusarenona X, a toxina HT-2 e o neosolaniol (2).

Os alimentos mais frequentemente contaminados com níveis elevados de DON são o trigo, a cevada, o milho (24, 34), detectando-se níveis mais baixos em aveia, arroz, centeio e sorgo (24).

O DON, também designado por vomitoxina, é um tricoteceno do tipo B, cuja estrutura se encontra representada na figura I.4.

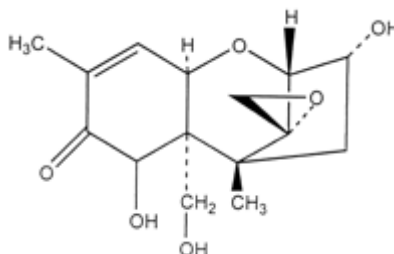


Figura I.4: Estrutura química do desoxinivalenol (DON).

Os efeitos agudos principais resultantes da exposição ao DON nos animais são a diminuição do consumo de ração (anorexia) e emese (vómitos) (24).

O DON tem vindo a ser associado a uma série de intoxicações no Homem. No vale de Cashemira, na Índia, em 1987, ocorreu um surto de doença de origem alimentar envolvendo cerca de 50.000 pessoas, atribuído ao consumo de pão confeccionado com farinha de trigo contaminada com tricotecenos, incluindo o DON (15). Apesar da ocorrência deste e de outros surtos em diversos países, a JECFA salientou que não se registou nenhum caso de morte associada à exposição ao DON e que os dados disponíveis

relativos à toxicidade não indicam que esta toxina seja carcinogénica. A avaliação toxicológica do DON não evidenciou de forma adequada a existência de efeitos carcinogénicos em animais de laboratório, tendo sido classificado no grupo 3, ou seja, no grupo dos compostos não classificáveis quanto ao seu potencial carcinogénico para o Homem (1).

Apesar de ser menos tóxico que outros tricotecenos, o DON é o mais frequente nos alimentos, tendo sido estabelecido para este composto um NOEL de 0,1 mg/kg de peso corporal por dia. O SCF avaliou o DON em Dezembro de 1999 tendo estabelecido uma TDI de 1 µg/kg peso corporal para esta micotoxina (41).

3.5. Zearalenona

A zearalenona (ZEA) também conhecida como toxina F-2 é uma micotoxina estrogénica produzida por numerosas espécies de fungos do género *Fusarium* especialmente *F. graminearum* e *F. culmorum* (figura I.5).

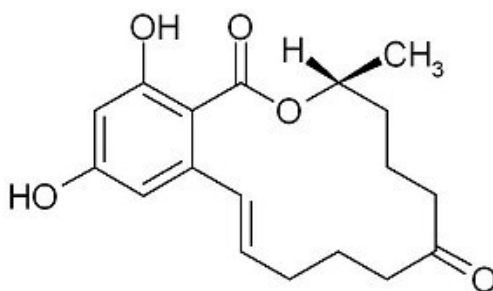


Figura I.5: Estrutura química da zearalenona (ZEA).

Os fungos produtores de ZEA colonizam com frequência culturas de cereais um pouco por todo mundo, em particular em países de clima temperado e nas culturas de milho, aveia, cevada, trigo e sorgo (15, 24, 34).

Apesar de apresentar uma baixa toxicidade aguda, a presença de ZEA em alimentos para animais há muito que constitui uma preocupação para os criadores. A ZEA é um desregulador endócrino de origem natural que produz uma síndrome estrogénica em diversas espécies animais, particularmente, em porcos de onde resultam efeitos graves a nível do sistema reprodutor (34).

No Homem, existe referência a um caso de hiperestrogenismo atribuído ao consumo de alimentos contaminados com ZEA, ocorrido no Porto Rico, caracterizado pela ocorrência

de um surto de puberdade precoce em crianças. Na África do Sul a ocorrência de ginecomastia com atrofia testicular foi associada ao consumo de milho contaminado com ZEA (15).

Tem sido referida a coexistência de ZEA com outras micotoxinas, em particular com os tricotecenos nivalenol e desoxinivalenol, o que não surpreende, dado que todas estas toxinas são produzidas essencialmente pelas mesmas espécies de *Fusarium*.

A avaliação toxicológica da ZEA evidenciou de forma limitada a existência de efeitos carcinogénicos em animais de laboratório tendo sido classificada no grupo 3 (1). O SCF estabeleceu em Junho de 2000 um valor de TDI de 1 µg/kg de peso corporal para esta toxina (42).

3.6. Alcalóides do Ergot

Os Alcalóides do Ergot são micotoxinas produzidas nos esclerócios de algumas espécies de *Claviceps*, nomeadamente a *Claviceps purpúrea*. Classificam-se como alcalóides indólicos, apresentando em comum, a estrutura do ácido lisérgico. Os Alcalóides do Ergot incluem quatro compostos, a ergotamina, a ergocristina, a ergocriptina e a ergocornina, cujas estruturas químicas estão ilustradas na figura I.6 (13).

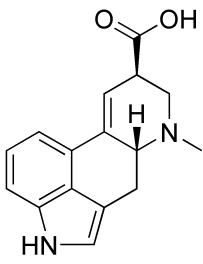
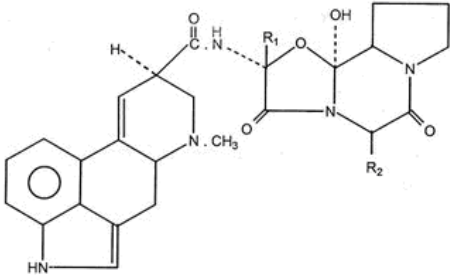
Ácido lisérgico	Alcalóides do Ergot	
		
Nome	R ₁	R ₂
Ergotamina	— CH ₃	— CH ₂ C ₆ H ₅
Ergocristina	— CH(CH ₃) ₂	— CH ₂ C ₆ H ₅
Ergocriptina	— CH(CH ₃) ₂	— CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Ergocornina	— CH(CH ₃) ₂	— CH(CH ₃) ₂

Figura I.6: Relação entre a estrutura do ácido lisérgico e os Alcalóides do Ergot.

A micotoxicose aguda mais antiga relacionada com epidemias humanas é o Ergotismo, também conhecido pelo nome de “Envenenamento por Ergot” ou “Fogo de Santo António”, doença provocada pelo consumo de alimentos confeccionados a partir de cereais contaminados com esclerócios do fungo *Claviceps purpurea*. Este fungo biossintetiza uma classe de metabolitos secundários conhecidos como Alcalóides do Ergot e, dependendo das suas estruturas químicas, exercem actividade no sistema nervoso central e/ou vasoconstrição. As micotoxinas de *Claviceps purpurea* (ergotamina) produzem uma sensação de fogo nas extremidades do corpo (mãos e pés) e alucinações, podendo conduzir à morte. Ocorreram vários surtos desta doença na Europa, durante a Idade Média, existindo registos que referem a ocorrência de 132 epidemias de ergotismo entre os séculos sexto e décimo oitavo

Reconhecem-se geralmente a existência de duas formas de ergotismo, a convulsiva e a gangrenosa. A forma convulsiva afecta o sistema nervoso central enquanto a forma gangrenosa afecta o fornecimento de sangue às extremidades.

Actualmente os métodos usados na limpeza do grão eliminam os esclerócios e consequentemente, erradicaram quase na totalidade o ergotismo como doença no Homem.

3.7. Patulina

Como a micotoxina em estudo neste trabalho é a patulina, esta será apresentada num capítulo independente.

4. Micotoxinas emergentes

Muito do trabalho desenvolvido nas últimas décadas têm-se focado principalmente nas aflatoxinas, ocratoxina A e tricotecenos. No entanto, um dos géneros que mais contamina os cereais em grão, o *Fusarium spp.* tem a capacidade de produzir outros metabolitos secundários tóxicos, considerados toxinas emergentes, incluindo fusaproliferina, beauvericina, eniantina e moniliformina (43).

Consideram-se micotoxinas emergentes aquelas que podem contaminar alimentos para consumo humano e animal e que podem tornar-se um risco para a saúde do consumidor num futuro próximo. Existem vários tipos de micotoxinas emergentes: as novas formas de uma micotoxina ainda não identificadas, as micotoxinas pouco estudadas, as micotoxinas conhecidas que anteriormente não estavam associadas aos alimentos e as micotoxinas conhecidas que anteriormente estavam controladas e que deixaram de o estar (44).

Ainda no âmbito das micotoxinas emergentes, existe a preocupação relativamente à ocorrência de micotoxinas em zonas do globo onde a sua presença não é habitual, provocada por alterações climáticas, e que tem vindo a ganhar importância crescente nos últimos anos. Em 2007 foi realizado um estudo sobre “fontes de informação para a detecção de riscos associados a micotoxinas emergentes”, projecto desenvolvido no Instituto Nacional para a Saúde e para o Ambiente dos Países Baixos - RIVM (“National Institute for Public Health and the Environment”) (45), onde se refere que o clima desempenha um papel muito importante na contaminação com micotoxinas. De um modo geral, o impacto do clima na fase anterior à colheita envolve o “stress” da planta provocado por situações de seca prolongada, dando origem a danificação das culturas, o que as deixa mais susceptíveis ao desenvolvimento de fungos. O impacto do clima na fase pós-colheita envolve dificuldades no processo de secagem das culturas, provocadas, por exemplo, por chuvas prolongadas, o que favorece o crescimento de fungos. A monitorização das condições climáticas nos locais de cultivo pode ser portanto bastante útil na detecção de riscos associados a micotoxinas emergentes.

Um exemplo recente de como as alterações climáticas podem condicionar a infecção de certas plantações com fungos toxigénicos, o seu crescimento e a produção de micotoxinas foi o que ocorreu em Itália durante o ano de 2003. As condições climáticas particulares desse verão - quente e seco, levaram ao desenvolvimento de *Aspergillus flavus* em plantações de milho fragilizado pela seca e consequente produção de quantidades apreciáveis de aflatoxinas, particularmente de aflatoxina B₁ (46, 47). A alimentação de vacas produtoras de leite com este milho contaminado levou ao

aparecimento de níveis anormalmente elevados de aflatoxina M_1 (derivado hidroxilado da B_1), no leite. Este problema emergente das aflatoxinas no milho em Itália levou ao desenvolvimento de um sistema de alerta, baseado na recolha e análise de dados meteorológicos e à construção de um modelo predictivo para *A.flavus* (46).

Capítulo II - Patulina

1. Breve nota histórica

A patulina foi descrita pela primeira vez na década de 40 como antibiótico, logo após a descoberta da penicilina (48). Foi isolada a partir do fungo *Penicillium patulum*, mais tarde designado por *Penicillium urticae*, actualmente designado por *Penicillium griseofulvum* (13, 48). Os primeiros estudos efectuados centraram-se na sua potencial utilização como antibiótico, tendo sido testada a sua utilização na forma de spray nasal para o tratamento de constipações e na forma de pomada para o tratamento de infecções de pele provocadas por fungos. Apesar de possuir forte actividade antibiótica contra várias bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis*, e também actividade antifúngica, durante as décadas de 50 e 60 verificou-se que apresentava efeitos tóxicos elevados, quer para plantas, quer para os animais. Por este motivo, foi abandonada a utilização da patulina como medicamento e nos anos 60 foi reclassificada como micotoxina (13, 49, 50).

Os registos de efeitos tóxicos em animais associados ao consumo de alimentos contaminados com patulina são reduzidos. Em 1954, no Japão, associou-se a patulina à morte de 100 vacas que consumiram malte de cevada contaminada (51). O consumo de resíduos de malte de cevada contaminados com patulina foi também associado a problemas tóxicos em bovinos, os quais se caracterizaram por perturbações neurológicas (52). Um outro caso refere a associação de patulina à ocorrência da síndrome hemorrágica e morte de gado após consumo de silagens contendo esta micotoxina (53).

2. Caracterização química

Quimicamente, a patulina é uma lactona heterocíclica insaturada (54), designada por 4-hidroxi-4H-furo[3,2c]piran-2(6H)-ona, cuja estrutura química se encontra representada na figura II.1. A patulina pode também ser designada como claviformina, clavacina, clavaina expansina, micoína, micoína C, penicidina e terinina (7).

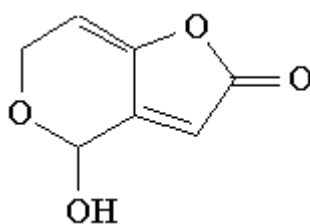


Figura II.1: Estrutura química da patulina (4-hidroxi-4H-furo[3,2c]piran-2(6H)-ona).

A patulina é um sólido cristalino incolor com um peso molecular de 154,12 g/mol, ponto de fusão de 111 °C (55), com uma absorvência máxima a 276 nm e uma absortividade molar de 14 600 L mol⁻¹ cm⁻¹ em etanol (56). É solúvel em água, etanol, acetona, acetato etilo, éter etílico e clorofórmio mas insolúvel em benzeno e éter de petróleo. A patulina possui uma considerável estabilidade térmica a pH<6, é instável em soluções alcalinas (56) e degrada-se de forma gradual durante o armazenamento em presença de sulfitos, grupos sulfidril e ácido ascórbico (55).

3. Ocorrência da patulina em géneros alimentícios

A patulina é um metabolito secundário tóxico produzido por diversos fungos pertencentes aos géneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*, os quais podem contaminar diversos tipos de alimentos (57).

As espécies de *Penicillium* que já foram identificadas como produtoras de patulina são: *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomyicola*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. gladioli*, *P. griseofulvum*, *P. marinum*, *P. paneum*, *P. sclerotigenum* e *P. vulpinum* (58).

O género *Byssochlamys* possui duas espécies economicamente importantes, *B. nivea* e *B. fulva*, as quais causam deterioração de frutas e produtos processados a partir delas. Esse género fúngico é o principal causador da deterioração dos derivados de frutas após tratamento térmico (59).

O *Aspergillus clavatus* é uma das espécies encontrada nas forragens para os animais, nas quais também foram detectadas concentrações vestigiais de patulina e o fungo isolado produz patulina em meio de cultura (52).

De entre os fungos produtores, o *Penicillium expansum* é a espécie encontrada mais frequentemente em alimentos contaminados, sendo referido como o principal produtor de

patulina. Este fungo provoca o apodrecimento da fruta, com formação de bolor azul (2, 52, 60, 61).

A patulina tem sido detectada em muitas frutas, produtos hortícolas, cereais e outros alimentos mas as principais fontes de contaminação são as maçãs e os produtos à base de maçã. A contaminação com patulina encontra-se associada principalmente às zonas do alimento em decomposição, difundindo-se até cerca de 1 cm para as zonas circundantes não afectadas pelo bolor (62). A principal via de exposição do Homem à patulina é a via alimentar, através do consumo de sumo de maçã ou outros produtos à base de maçã, fabricados a partir de fruta deteriorada, contaminada com patulina.

Os fungos produtores de patulina, particularmente o *P. expansum*, são contaminantes habituais de frutos, incluindo maçãs, peras uvas, cerejas, ameixas, alperces, pêsegos, damascos, nectarinas, framboesas, amoras, morangos, bananas, mirtilos e groselhas, e também de produtos hortícolas, incluindo tomate, podendo ainda estar presentes em cereais, frutos de casca rija (amêndoas, nozes, avelãs e amendoins) e queijo (19, 53, 60).

Numerosos estudos referem a presença de patulina em diferentes produtos de transformação da fruta incluindo sumo de maçã, maçã-acerola, uva, pêra, ginja, groselha, laranja, ananás e maracujá, puré de maçã, compotas de groselha e de mirtilos e alguns tipos de alimentos para criança (53). A sidra doce de maçã também pode ser afectada mas apenas se após a fermentação for adicionado sumo de maçã (63).

A figura II.2 ilustra o aspecto típico de uma maçã afectada com fungos produtores de patulina.



Figura II.2: Maçãs contaminadas com bolor azul. O *P.expansum* é um dos fungos que provoca a formação de bolor azul (64).

Em 2001, a FDA refere num documento relativo à avaliação da segurança e gestão de risco para a patulina (20) que, devido à natureza do alimento, aos processos de fabrico ou às práticas de consumo, a patulina parece não constituir motivo de preocupação em termos de segurança alimentar, à excepção do sumo de maçã. Como exemplos, a FDA refere que, no caso do queijo, a presença de um elevado teor de cisteína interage com a patulina inactivando-a e no caso dos frutos, as partes deterioradas são removidas antes do seu consumo. A fermentação parece destruir a patulina e como tal, não é detectada em bebidas alcoólicas produzidas a partir de fruta, nem em vinagres de fruta. No caso dos sumos de maçã, o processamento térmico (pasteurização) parece reduzir apenas de forma moderada o teor de patulina, pelo que a toxina inicialmente presente no sumo de maçã irá resistir aos processos de pasteurização e ocorrer no produto final.

De forma a poder avaliar a exposição das crianças à patulina, é importante conhecer os níveis de contaminação dos alimentos destinados a lactentes e crianças jovens. Neste âmbito, têm sido publicados ao longo dos últimos 20 anos diversos estudos de ocorrência de patulina em diversos países com o objectivo de avaliar a extensão e os níveis de contaminação de maçãs e de produtos à base de maçã (2, 53, 57). De um modo geral, os resultados obtidos nos vários estudos publicados indicam que cerca de 50% dos sumos de maçã analisados a nível mundial apresentam níveis detectáveis de contaminação com patulina (2, 57), embora na maior parte dos casos não ultrapassem o nível máximo permitido de 50 µg/kg (9). Alguns estudos detectaram a presença de níveis bastante elevados de contaminação, citando como exemplo um valor de 376 µg/kg em sumo de maçã concentrado (5) ou um teor de 497 µg/kg em sumo de maçã (65). A contaminação pode ser por vezes extremamente elevada, alcançando níveis de 8000 µg/L em sumo de maçã fabricado a partir de maçãs parcialmente bolorentas (2) ou valores de 113 mg/kg em zonas danificadas de maçãs parcialmente bolorentas (61) .

Na tabela II.1 apresentam-se alguns resultados sobre a ocorrência de patulina em vários alimentos, incluindo maçãs, sumos de maçã, produtos destinados à alimentação infantil e outros produtos à base de fruta, em diversos países.

Em Portugal existem poucos dados sobre ocorrência de patulina em alimentos, não tendo sido publicado até à data nenhum estudo de ocorrência em alimentação infantil. Em 2000, um estudo de ocorrência de patulina em 351 maçãs com pequenas zonas apodrecidas verificou que 68,6% dos frutos apresentam níveis detectáveis de contaminação, nalguns casos com concentrações superiores a 80 mg/kg (66). Num outro estudo publicado em 2002 foram analisadas 36 amostras de sumo de maçã e de pêra, límpidos e turvos. Nas amostras com 100% maçã (quinze), os sumos turvos apresentaram patulina em 88% das 8 amostras

analisadas, com uma concentração média de 10,5 µg/L e máxima de 25,2 µg/L. Nenhuma das 7 amostras de de sumo límpido apresentou níveis detectáveis de patulina (67).

Tabela II.1 Estudos de ocorrência de patulina em géneros alimentícios.

Género Alimentício	País;Ano	Positivos/ total	Nº Amostras > 50 µg/L	Conc. max.	Ref
Sumo de maçã e puré orgânico e convencional; alimentação infantil	Holanda, 2005	1/63	0	*	(68)
Sumo de maçã	Irão, 2001/2002	29/42	14	285 µg/L	(69)
	Japão, 2004	15/76	0	45 µg/L	(70)
	China, 2007	3/52	3	88 µg/L	(71)
	Tunísia, 2007	4/25	0	6,0 µg/L	(72)
	Espanha, 2009	66/100	11	118 µg/L	(73)
	Itália, 2005	25/53	0	48 µg/kg	(74)
	Bélgica, 2001	35/43	0	39 µg/L	(57)
Bebidas à base de maçã	Brasil, 2008	4/134	0	7 µg/L	(75)
Sumo de maçã concentrado ¹	Irão, 2001-2002	18/23	13	148 µg/L	(69)
Sumo de maçã convencional e biológico	Itália, 2003-2004	16/33 e 12/24	*	53 e 69 µg/kg	(76)
	Itália, 2003	3/11 e 3/10	1	33 e 56 µg/kg	(77)
	Bélgica, 2006	22/177	2 (biológicos)	66 µg/L	(60)
Puré de maçã, alimentação infantil	Tunísia, 2007	0/10	0	n.a.	(72)
	Itália; 2003-2004	3/23	0	0,50 µg/kg	(76)
	Itália, 2003	2/10	0	18 µg/kg	(77)

¹ Todas as amostras foram reconstituídas (11,2-11,5° Brix) a partir do sumo concentrado.

*: informação não disponível nos artigos consultados

n.a.: não aplicável

4. Alimentos de origem biológica

A agricultura biológica é um modo de produção - modo de produção biológico - que se baseia num conjunto de princípios e práticas que visam minimizar o impacto humano sobre o ambiente e assegurar que a produção se processa da forma mais natural possível (78). É um sistema agrícola que procura fornecer ao consumidor, alimentos frescos, saborosos e autênticos e ao mesmo tempo respeitar os ciclos de vida naturais.

A nível europeu a produção de alimentos de origem biológica obedece ao Regulamento n.º 834/2007 do Conselho, de 28 de Junho de 2007, que define as regras de rotulagem e produção de alimentos biológicos e o sistema de inspecção para este tipo de produtos (79).

Em Portugal, tal como noutros países europeus, o interesse pela agricultura biológica tem vindo a aumentar nos últimos anos. Apesar de ser uma prática mais antiga, foi a partir dos anos 90 que a agricultura biológica se começou a expandir no nosso país (78). Em 2005 estavam registados mais de 1500 operadores dedicados à produção biológica (80) e em 2007 existiam só na região do Alentejo 569 operadores na produção vegetal, ocupando uma superfície superior a 139000 hectares (78).

Durante a produção deste tipo de alimentos, a utilização de certo tipo de produtos como pesticidas, fertilizantes sintéticos, antibióticos, aditivos alimentares e auxiliares tecnológicos, encontra-se restringida .

No entanto, não existem estudos conclusivos sobre o efeito da redução da utilização de pesticidas, sobre a produção de micotoxinas, tais como a patulina. É possível que a redução da utilização de fungicidas possa conduzir a uma maior degradação das culturas pelos insectos, originando uma maior invasão pelos fungos e consequente produção de micotoxinas. Existem diversos estudos, onde se comparam os níveis de patulina presente em produtos biológicos e convencionais, mas os resultados não são concordantes (60, 74, 76, 77, 81). Uma das limitações destes estudos deve-se ao número reduzido de amostras analisadas, o qual, não é muitas vezes suficiente para efectuar uma avaliação credível, já que para isso é necessário um elevado número de resultados analíticos.

5. Propriedades toxicológicas

Diversos efeitos nocivos têm sido descritos associados à patulina, baseados em estudos de toxicidade efectuados em animais, de onde se destacam efeitos de toxicidade aguda em ratinhos (82), efeitos mutagénicos (83) e efeitos imunossupressores em ratinhos e coelhos (84). Nesta secção irão ser apresentados resumidamente os vários efeitos tóxicos da patulina.

A patulina foi avaliada pela IARC em 1976, 1986 e 1987 (7, 85, 86).

A IARC refere, na avaliação efectuada em 1986, que não existiam disponíveis registos de casos ocorridos nem estudos epidemiológicos sobre a carcinogenicidade da patulina em humanos. Na avaliação da toxicidade da patulina, o grupo de trabalho da IARC concluiu que a evidência de efeito cancerígeno é inadequada para o Homem e inadequada ou limitada nos animais. Com base nesta avaliação, a IARC classificou a patulina como carcinogénico do grupo 3, isto é “não classificável quanto à sua carcinogenicidade em humanos” (86).

No entanto, nos últimos anos, inúmeros estudos têm sido realizados com o objectivo de evidenciar a toxicidade desta micotoxina (87-95).

Embora os resultados do teste de Ames para avaliação do potencial mutagénico da patulina tenham dado resultados negativos, alguns estudos demonstraram que a patulina provoca alterações a nível dos cromossomas (96). Outros estudos revelaram que a patulina é mutagénica, induzindo lesões no ADN, aberrações cromossómicas e formação de micronúcleos em células de mamífero (97).

O Comité sobre Mutagenicidade de Substâncias Químicas nos alimentos, Produtos de Consumo e Ambiente do Reino Unido (“UK Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment”), classificou a patulina como mutagénica (98).

Em 2003 foi realizado um estudo com o objectivo de avaliar os efeitos genotóxicos e lesões oxidativas induzidos pela patulina, em três tipos celulares. Os resultados obtidos sugerem que a patulina é clastogénica e pode provocar lesões oxidativas sobre o ADN (93).

Considera-se que as modificações do ADN resultantes da acção oxidativa de certos compostos podem contribuir de forma significativa para a mutagénese e para a iniciação do cancro. Por este motivo, o conhecimento do nível de genotoxicidade e dos efeitos

oxidativos das micotoxinas em geral e da patulina em particular, em células humanas, possibilita uma melhor avaliação do risco para a saúde das populações associado à exposição a esta micotoxina (93).

Foram realizados vários estudos sobre as propriedades electrofílicas da patulina e a sua capacidade em formar aductos covalentes com diversas moléculas nucleófilas, nomeadamente com as proteínas. A patulina exerce a sua acção citotóxica principalmente através da formação de aductos covalentes entre os grupo tiol (SH) e as proteínas celulares, as quais podem induzir alterações no ADN e também, a morte celular (94).

Ao nível celular, a patulina revelou efeitos que incluem a ruptura da membrana celular plasmática (90) e a inibição da síntese de DNA (91). Segundo Arafat & Musa (1995) (99), a patulina inibe o crescimento e a síntese proteica em culturas celulares hepáticas devido ao bloqueio da captação dos aminoácidos por meio da membrana e também à sua incorporação nas proteínas.

A pele pode constituir uma via de exposição à patulina para as pessoas que manuseiam alimentos, principalmente as da indústria alimentar, que estão envolvidas na manipulação da fruta antes e após a colheita (26).

Saxena e colaboradores (26) realizaram um estudo de toxicidade cutânea da patulina em ratinhos, utilizando diferentes doses e tempos de contacto. Como existem dados que referem níveis de 288 µg de patulina na parte exterior dos frutos, este pode ser um valor indicativo do que poderão ser os níveis de exposição humana à patulina através da pele. Nos estudos de Saxena, para um valor de exposição de 160 µg os resultados indicaram que a patulina provoca lesões no ADN, conduzindo a paragem do ciclo celular e apoptose. Estes resultados sugerem a existência de possíveis efeitos tóxicos provocados pela patulina a nível da pele.

Num estudo de embriotoxicidade em ratinhos, a dose oral administrada provocou a morte da progenitora com hemorragias cerebrais, pulmonares e cutâneas (100). A JECFA avaliou em 1995 os dados toxicológicos relativos à patulina e concluiu, com base nos estudos toxicológicos disponíveis, que a patulina não possui efeitos teratogénicos mas apresenta efeitos embriotóxicos acompanhados por toxicidade materna (98).

De acordo com a avaliação da FDA, realizada em 2000, os estudos de toxicidade não demonstraram uma clara evidência de carcinogenicidade ou de potencial mutagénico em células germinais. Estes estudos demonstraram ainda que os efeitos tóxicos no feto ou no

embrião de roedores se manifestam apenas após administração de doses de patulina que também são tóxicas para as progenitoras (19, 101).

Em 2006, Selmanoglu avaliou a toxicidade reprodutora da patulina em ratos, aos quais se administrou uma dose de 0,1 mg/kg de peso corporal/dia. Os resultados revelaram que a patulina provocou um decréscimo no número de espermatozóides, um ligeiro aumento das anomalias morfológicas dos espermatozóides e algumas alterações histopatológicas dos órgãos reprodutores (102).

Numerosos estudos *in vitro* demonstram que a patulina inibe múltiplas funções dos macrófagos. Mais recentemente, Wichmann e colaboradores (2002) (91) mostraram que a patulina inibe apenas de forma moderada, quando comparada com outras micotoxinas, a expressão do interferão alfa ou da interleucina IV pelos macrófagos.

Estudos *in vivo* realizados em ratinhos revelaram que os efeitos da patulina no sistema imunitário não têm, segundo os autores, consequências em termos funcionais, não se verificando alterações significativas da função imunitária dos ratinhos tratados com patulina. Este estudo mostra ainda que os efeitos imunotóxicos se encontram associados apenas a doses muito mais elevadas do que as doses a que os seres humanos estão habitualmente expostos. Os autores concluem que a patulina não altera a resposta imunitária a níveis correspondentes aos que em princípio serão os da exposição alimentar humana (103).

Em 2004, um estudo *in vitro* e *in vivo* sobre a absorção e o metabolismo da patulina efectuado por Rychlik, mostrou que a patulina mesmo em concentrações elevadas pode ser degradada durante o seu percurso pelo sistema gastrointestinal. O mesmo estudo demonstrou que a patulina desaparece rapidamente após mistura com o sangue total. Este estudo concluiu que a patulina exercerá a sua acção tóxica essencialmente a nível local, não se lhe podendo atribuir efeitos sistémicos (92).

A dose letal 50 (DL₅₀) por via intraperitoneal é de 5 mg/kg em ratinhos (98). Os sintomas de toxicidade incluem neurotoxicidade (agitação, convulsões), associada a congestão pulmonar e ulceração e inflamação intestinal.

Com base nos estudos de toxicidade de longo termo efectuados em animais, a JECFA avaliou a toxicidade da patulina e estabeleceu doses seguras para o Homem. Em 1990 a JECFA estabeleceu um valor de dose semanal admissível provisória, PTWI de 7 µg/kg de peso corporal por semana (16).

A patulina foi reavaliada em 1995 pela JECFA tendo sido estabelecido um valor de dose diária admissível máxima provisória, PMTDI de 0,43 µg por kg de peso corporal por dia (104).

A FDA efectuou em 2001 uma revisão dos dados de toxicidade da patulina, tendo estabelecido também um valor de 0,43 µg/kg de peso corporal por dia (19).

Embora os estudos de ocorrência demonstrem que a exposição da população europeia está muito abaixo da PMTDI, existem grupos específicos de consumidores, nomeadamente os lactentes e as crianças jovens, que estão mais expostos, uma vez que consomem mais produtos derivados de maçã (105).

5.1. Avaliação da exposição

A avaliação da exposição é a avaliação científica dos efeitos nocivos conhecidos ou potenciais que resultam da exposição humana a determinado perigo. A avaliação de risco é um processo fundamentado em conhecimentos científicos, envolvendo as seguintes fases: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco. Na área alimentar cada uma destas etapas tem objectivos diferentes, nomeadamente (106, 107):

- A identificação do perigo, que consiste na identificação dos agentes biológicos, químicos e físicos que podem causar efeitos adversos à saúde e que podem estar presentes num determinado alimento ou grupo de alimentos.
- A caracterização do perigo, que é a avaliação qualitativa e ou quantitativa da natureza dos efeitos adversos para a saúde, associados com agentes biológicos, químicos e físicos que podem estar presentes nos alimentos.
- A avaliação da exposição, que é a avaliação qualitativa e ou quantitativa da ingestão provável de agentes biológicos, químicos e físicos através dos alimentos, assim como as exposições que derivam de outras fontes, caso sejam relevantes.
- A caracterização do risco, que é a estimativa qualitativa e ou quantitativa, incluídas as incertezas inerentes, da probabilidade de ocorrência de um efeito adverso, conhecido ou potencial, e da sua gravidade para a saúde de uma determinada população, com base na identificação do perigo, sua caracterização e a avaliação da exposição.

Um dos principais objectivos da avaliação do risco é a documentação e análise da evidência científica para medir o risco e identificar os factores que o influenciam para utilização dos gestores do risco.

A exposição às micotoxinas depende do nível destas substâncias nos diferentes alimentos e da ingestão desses alimentos pela população. Podem existir grandes diferenças nacionais e regionais quanto à ingestão dos alimentos, devido a hábitos alimentares diferentes, o que faz com que as avaliações de exposição sejam específicas para cada país. Os rastreios aos alimentos são feitos ao longo de vários anos, para reunir dados sobre os níveis de contaminação a que as populações estão expostas. Podem-se refinar as estimativas com outros factores, como processamento dos alimentos tanto pela indústria como em casa. A exposição varia com a idade, sendo mais significativa nas crianças, as quais, regra geral, estão mais expostas a certos alimentos. Estudos da exposição podem ser conduzidos avaliando os níveis de micotoxinas presentes no sangue ou noutros fluidos fisiológicos.

Os alimentos à base de maçã encontram-se habitualmente presentes na dieta de lactentes e crianças jovens, que consomem, de um modo geral, quantidades elevadas deste tipo de alimentos. Um estudo realizado nos Estados Unidos refere um consumo de maçãs (ou derivados) no primeiro ano de vida de 6,4 g/kg de peso corporal por dia e de 0,4 g/kg peso corporal por dia em adultos (108). Outros países, como a Itália, referem valores de 2,9 g/kg peso corporal/dia para crianças entre 1 e 10 anos e valores de 0,2 g/kg peso corporal/dia para adultos (76). A diferença do consumo alimentar (por unidade de peso corporal) observada em crianças e adultos significa que, para uma determinada concentração de um contaminante, uma criança irá estar sujeita a uma exposição maior (em termos de mg/kg peso corporal) que um adulto consumindo a mesma quantidade de maçã (61).

Para proteger este grupo etário mais susceptível foi estabelecido a nível europeu um valor de 10 µg/kg como limite para a contaminação com patulina, de produtos à base de maçã destinados à alimentação infantil (9).

De forma a avaliar a exposição à patulina foi realizado em 2003 pela SCOOP (“Scientific Cooperation on Questions Related to Food”) um estudo de avaliação da ingestão alimentar de patulina pelas populações dos Estados Membros da União Europeia (55). Para cada país foi efectuada uma estimativa de ingestão de patulina por alimento (sumo de maçã concentrado, sumo de maçã, sidra, sumo de uva, sumo de pêra, outros sumos e purés de

maçã) e por grupo populacional, com base nos dados de ocorrência e de consumo. A maioria dos países apresentou dados de consumo para toda a população sendo escassa a informação relativa ao consumo da população infantil. No caso de Portugal foram apresentados dados de consumo para a população em geral e apenas foram fornecidos dados relativos ao total de sumos consumidos.

Os resultados obtidos revelaram que os alimentos com maior incidência de contaminação com patulina incluíam, por ordem decrescente: sumo de maçã concentrado (96%), sumo de maçã (57,4%), sidra (37,2%), sumo de uva (39,5%) e sumo de pêra (17%). Os produtos para alimentação infantil apresentaram uma contaminação de 13,8% e os purés de maçã de 7,2%. No caso de Portugal, verificou-se que o sumo de maçã/néctar de maçã representou a principal fonte de ingestão de patulina. O sumo de pêra contribuiu também, embora em menor grau.

Estes resultados mostraram ainda que a percentagem de amostras com teores superiores a 50 µg/kg foi de 2,4% o que indica que os produtos que circulam na União Europeia apresentam uma boa qualidade sanitária em relação à contaminação com patulina.

Segundo o mesmo estudo, a exposição da população europeia à patulina situa-se abaixo dos 193,45 ng/kg de peso corporal por dia. No entanto, verificou-se que existem grupos populacionais específicos como é o caso das crianças jovens que se encontram mais expostas dado que, de um modo geral, consomem maiores quantidades de produtos à base de maçã. Assim, e de forma a proteger, em particular, a saúde das crianças, foi recomendada a redução da patulina para este grupo populacional, até ao nível mais baixo possível.

No caso de Portugal o valor de exposição é de 0,3 ng/kg de peso corporal por dia, para todos os grupos populacionais considerados. (55). Comparativamente com o valor de PMTDI (0,4 µg/Kg de peso corporal) a exposição da população portuguesa à patulina é bastante inferior ao valor referido.

5.2. Controlo da contaminação por patulina

É muito importante tomar medidas que visem a redução e prevenção da contaminação da fruta com patulina, evitando o desenvolvimento dos fungos na fruta, antes e após a colheita, assim como, nos respectivos produtos derivados, em especial nos produtos à base de maçã.

Com este objectivo, devem ser aplicadas as medidas preconizadas pela Recomendação da Comissão de 11 Agosto de 2003 (2003/598/CE), relativa à prevenção e redução da contaminação por patulina do sumo de maçã e dos ingredientes do sumo de maçã noutras bebidas (109). Nesta recomendação refere-se que a indústria de transformação de maçã deveria excluir a fruta estragada do seu processo de produção, sendo a sua aparência um bom indicador do nível de contaminação. Contudo, uma vez que a patulina pode também estar presente em frutos que não se apresentem visivelmente deteriorados ou estragados na sua superfície externa, não se pode excluir totalmente a contaminação através da triagem visual e eliminação de todos os frutos deteriorados ou estragados. Recomenda-se ainda a implementação de um código de Prática na União Europeia, recomendando aos Estados-Membros que:

Adoptem as medidas necessárias para garantir que o “Código de Prática para a prevenção e redução da contaminação por patulina do sumo de maçã e dos ingredientes do sumo de maçã noutras bebidas”, descrito no anexo da 2003/598/CE, seja implementado por todos os operadores da indústria de transformação de maçã.

Assegurem que todas as medidas adequadas, incluindo se necessário, acções correctivas, são tomadas pelos operadores da indústria de transformação de maçã, de forma a serem alcançados teores inferiores ao teor máximo de 50 µg/kg para os sumos de maçã, com o objectivo de alcançar, como alvo, o teor de 25 µg/kg de patulina.

O Código de Prática contém os princípios gerais para a prevenção da presença de patulina no sumo de maçã e inclui dois tipos de controlo, designados por Boas Práticas de Agricultura e Boas Práticas de Fabrico. Recomenda-se também a implementação de um sistema de gestão após colheita com base nos princípios do HACCP (“Hazard Analysis and Critical Control Points”, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo) para a redução da patulina no sumo de maçã.

A plena implementação do “Código de Prática para a prevenção e redução da contaminação por patulina do sumo de maçã e dos ingredientes do sumo de maçã noutras bebidas” resultará numa nova redução do nível de contaminação.

Um dos aspectos mais importantes no âmbito das Boas Práticas de Agricultura, relaciona-se com o controlo da qualidade da fruta durante o seu crescimento, no campo, vigiando e aplicando pesticidas se necessário. A apanha, manuseamento e transporte deve ser efectuada de forma a minimizar os danos físicos da fruta. A qualidade da fruta colhida é o

primeiro passo no controlo dos níveis de patulina. Geralmente, a fruta de melhor qualidade é destinada à venda directa ao público e a fruta de menor qualidade é utilizada no fabrico de sumo e de outros produtos derivados. Após a colheita e transporte até à fábrica, os frutos são geralmente armazenados em atmosfera controlada antes do seu processamento. É muito importante controlar as condições de armazenamento evitando as que favorecem o desenvolvimento de fungos. A presença de patulina verifica-se sobretudo em frutos deteriorados pelo bolor, apesar de a presença deste não implicar necessariamente a presença de patulina num fruto, mas indicar a possibilidade da sua presença.

Os fungos produtores de patulina são fungos saprófitas, naturalmente presentes nos solos. Os seus esporos podem ser detectados na fruta quando esta ainda se encontra na árvore, mas o fungo desenvolve-se preferencialmente após a colheita, durante o armazenamento. A existência de zonas danificadas na fruta, que constituem óptimos pontos de entrada de fungos, a manutenção de ambientes quentes e a não redução de níveis de oxigénio durante o armazenamento da fruta, antes da sua transformação, são condições favoráveis ao desenvolvimento de bolores. A produção de patulina parece depender de certos factores tais como a actividade da água (a_w), a temperatura, o pH, assim como, outras características químicas específicas da fruta. No caso do *P.expansum* as condições óptimas para o seu desenvolvimento e produção de patulina em maçã são de pH=6 e com uma temperatura de 17 °C. As zonas deterioradas por *P.expansum* apresentam inicialmente uma consistência mole e acastanhada e posteriormente uma cor azul, sendo possível nestas zonas encontrar teores elevados de patulina.

Nas Boas Práticas de Fabrico, a primeira fase de controlo da contaminação passa pela selecção criteriosa da fruta, eliminando as frutas podres e removendo as partes apodrecidas. A lavagem do fruto, ou a remoção do tecido bolorento, imediatamente antes da sua espremedura, não eliminará necessariamente toda a patulina presente no fruto, uma vez que alguma poderá ter migrado para tecido aparentemente saudável (62).

A utilização de um desinfectante como o hipoclorito de sódio na lavagem da fruta, impede a colonização de fungos e consequentemente a produção de patulina (110). Um reagente alternativo, como o peróxido de hidrogénio também inibe o crescimento de *P. expansum* e deste modo, pode ser usado com a mesma função (111).

No sumo de maçã, a adição de ácido ascórbico (500 mg/kg) reduziu em 70% os níveis de patulina (105). Segundo Drusch e colaboradores (2007) esta degradação rápida da patulina pelo ácido ascórbico necessita da presença de oxigénio e radicais livres. Estes formam-se durante a oxidação do ácido ascórbico pelo oxigénio e na presença de iões metálicos. Como nas embalagens de sumo, o espaço de cabeça é pequeno, os teores de oxigénio são muito baixos e consequentemente, a adição de ácido ascórbico antes do enchimento das embalagens não é uma estratégia eficiente de descontaminação (112).

As propriedades adsorventes do carvão activado podem ser utilizadas na redução dos teores em patulina em sumo de maçã. No entanto, pode ocorrer alteração da aparência e do sabor do sumo decorrente deste tratamento (113). A utilização de 3 grama de carvão activado por litro de sumo durante 5 minutos reduziu a patulina de 62,3 para 30,8 µg/kg (114).

A redução da quantidade de patulina durante o processo de clarificação do sumo foi relatada por vários autores. Bissessur e colaboradores (115) estudaram alguns tipos de clarificação e verificaram que a centrifugação é o método mais efectivo, com redução de 20,5% do total da toxina.

Welke e colaboradores (2009) estudaram a redução dos níveis de patulina em várias fases do fabrico de sumo de maçã, concluindo que após a pasteurização, o tratamento enzimático, a microfiltração e a evaporação, a redução do conteúdo de patulina foi de 40, 28, 20 e 28%, respectivamente (112).

O uso de leveduras com o objectivo de degradar a patulina foi demonstrado por Moss & Long (2002). Verificou-se que certas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* degradam a patulina durante a fermentação de sumo de maçã mas o mesmo não se passa em condições de aerobiose (116).

Dado que a fermentação alcoólica de sumos de fruta destrói a patulina, os produtos fermentados como a sidra e a perada não deverão conter patulina. No entanto, foi encontrada patulina em produtos fermentados aos quais foi acrescentado sumo de maçã depois da fermentação (53).

A patulina é relativamente estável à temperatura, em especial em pH ácido. Verificou-se que os tratamentos curtos a temperaturas elevadas (60 a 90 °C durante 10 segundos) resultam numa redução de cerca de 20 % das concentrações de patulina no alimento.

Contudo, o tratamento térmico por si só não é suficiente para garantir um produto isento de patulina (53).

O facto de não ser possível evitar totalmente a formação de patulina nas maçãs, nem garantir a remoção total da patulina dos tecidos afectados, em conjunto com factores relacionados com a incapacidade dos processos de tratamento térmico (pasteurização) em eliminar totalmente a toxina do produto final contribuem fortemente para que a ocorrência de contaminação de sumo ou de outros produtos a base de maçã com patulina possa ser significativo. Considera-se ainda que a presença e o nível de contaminação de patulina no produto final pode constituir um bom indicador da qualidade da fruta usada no fabrico (62).

Capítulo III - Aspectos regulamentares

1. Entidades oficiais

O reconhecimento de que as micotoxinas podem afectar a saúde levou ao estabelecimento de regulamentos em diversos países com o objectivo de proteger a saúde humana e animal. Alguns países e organizações com fins comerciais têm tentado estabelecer valores limite harmonizados para as diferentes micotoxinas. Isso poderá trazer vantagens para o comércio, mas poderá não ser benéfico do ponto de vista de protecção da saúde a nível mundial. O risco associado às micotoxinas depende quer do perigo que o composto representa, quer da exposição a esse composto. O perigo que as micotoxinas representam é geralmente o mesmo em todo o mundo, no entanto, a exposição não é a mesma devido à diferença nos níveis de contaminação dos alimentos e devido à diferença dos hábitos alimentares em diferentes populações a nível mundial. No caso de dietas em que a base da alimentação é o milho, por exemplo, o consumo de elevadas quantidades de milho contaminado por fumonisinas, mesmo que presentes em níveis permitidos pela legislação, leva a que se ultrapasse facilmente a PMTDI de 2 µg/Kg para o conjunto das fumonisinas (B₁, B₂ e B₃) (117).

É importante que as entidades governamentais promovam e financiem actividades que contribuam para avaliar a exposição a micotoxinas nos seus países, sendo igualmente importante que existam métodos analíticos pouco dispendiosos, validados e simples, integrados num sistema de garantia da qualidade analítica, de modo a que se possam obter dados fidedignos de ocorrência de micotoxinas.

Em 2003, cerca de 100 países (abrangendo cerca de 85% da população mundial) tinham estabelecido regulamentações ou guias para a ocorrência de micotoxinas em alimentos (106, 118).

Diversas instituições e organizações internacionais, tais como, a Comissão Europeia, a Agência Americana de Controlo da Qualidade de Produtos Alimentares e Farmacêuticos (FDA), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização da Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO - “Food and Agriculture Organization of the United Nations”) reconheceram a existência de um risco potencial para a saúde humana e animal resultante do consumo de alimentos e rações contaminadas com micotoxinas, tendo já elaborado legislação que estabelece limites para os diferentes grupos de micotoxinas e dentro de cada grupo, para certas toxinas em particular. A comissão

conjunta de peritos em aditivos alimentares da FAO/OMS, JECFA (“FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives of the United Nations”) é um organismo que funciona como consultor científico da FAO e da OMS e cuja função principal é avaliar a toxicidade de aditivos e contaminantes alimentares e de resíduos de medicamentos em produtos veterinários.

Actualmente, as regulamentações existentes são estabelecidas com base em pareceres científicos destas várias entidades, como é o caso da JECFA e da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, EFSA (“European Food Safety Authority”). Existem vários factores que afectam a elaboração das regulamentações para as micotoxinas, onde se incluem (117):

- Existência de dados toxicológicos disponíveis sobre as micotoxinas
- Existência de dados epidemiológicos disponíveis sobre as micotoxinas
- Conhecimento acerca da distribuição da concentração de micotoxinas nos lotes de produtos ou géneros alimentícios
- Existência de métodos analíticos
- Legislação existente noutros países com os quais se mantenha relações comerciais
- Necessidade de abastecimento alimentar em quantidade suficiente

Os primeiros dois factores fornecem informação necessária para a avaliação dos perigos e avaliação da exposição, respectivamente, que são a base da avaliação de risco, a qual, serve de base científica para o estabelecimento das regulamentações.

Os terceiro e quarto factores são importantes na medida em que permitem implementar o estipulado pelas regulamentações através de métodos de amostragem e de análise adequados.

Os últimos dois factores são factores sócio-económicos, igualmente importantes no estabelecimento de regulamentações e limites razoáveis para as micotoxina em alimentos para humanos e animais.

Todas estas entidades reconhecem a existência de um risco potencial para a saúde humana e animal associado às micotoxinas e têm desenvolvido nesta área diversas actividades de carácter científico e de âmbito legislativo, incluindo a harmonização das respectivas regulamentações. Na União Europeia, existiam em 2007 limites harmonizados estabelecidos para 40 combinações de micotoxina-alimento envolvendo 13 micotoxinas ou grupos de micotoxinas (117).

2. Teores máximos de patulina

Existe actualmente a nível da União Europeia legislação que estabelece limites máximos para os principais grupos de micotoxinas e dentro de cada grupo para algumas micotoxinas em particular.

O regulamento 1881/2006 de 19 de Dezembro fixa os teores máximos de certos contaminantes para certos géneros alimentícios e estabelece os níveis máximos para as seguintes micotoxinas: aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 e M_1), ocratoxina A, toxinas *Fusarium* (desoxinivalenol e zearalenona), patulina e fumonisinas (B_1 e B_2 , HT-2 e T-2). Neste regulamento encontram-se estabelecidos teores máximos de micotoxinas em alimentos para lactentes (bebés até aos 12 meses) e crianças jovens (1 a 3 anos), os quais, são inferiores aos teores máximos permitidos em alimentos destinados a outros grupos etários, com a finalidade de proteger, em particular, a saúde das crianças (9).

O anexo 8 indica os teores máximos de micotoxinas que podem estar presente em certos géneros alimentícios.

Com base no valor provisório de dose diária admissível de 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, a União Europeia definiu, através do Regulamento (CE) N.º1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006, os teores máximos de patulina em géneros alimentícios, os quais são apresentados na tabela III.1.

O valor de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fixado para produtos à base de maçã destinados a crianças e bebés foi estabelecido com vista a proteger lactentes e crianças jovens que têm um consumo de géneros alimentícios à base de fruta mais elevado quando comparado com os adultos.

Tabela III.1: Teores máximos de patulina em géneros alimentícios (9).

Géneros alimentícios	Teores máximos (µg/kg)
Sumos de frutos, sumos de frutos concentrados reconstituídos e néctares de frutos	50
Bebidas espirituosas, sidra e outras bebidas fermentadas derivadas de maçãs ou que contenham sumo de maçã	50
Produtos sólidos à base de maçã, incluindo compota e puré de maçã, destinados ao consumo directo, com excepção dos géneros alimentícios referidos abaixo	25
Sumo de maçã e produtos sólidos à base de maçã, incluindo compota e puré de maçã destinados a ser consumidos por lactentes e crianças jovens rotulados e vendidos enquanto tal	10,0
Alimentos para bebés, com excepção de alimentos à base de cereais transformados destinados a lactentes e crianças jovens ⁽¹⁾ .	10,0

⁽¹⁾ Os teores máximos referem-se aos produtos prontos para consumo (comercializados como tal ou reconstituídos em conformidade com as instruções do fabricante).

3. Requisitos para amostragem

A amostragem desempenha um papel muito importante no processo de análise de micotoxinas. Com efeito, mesmo que se tenham estabelecido e implementado métodos analíticos e de controlo de qualidade adequados, os resultados analíticos podem ser afectados por erros consideráveis, caso a amostragem não seja a adequada. Isto acontece principalmente devido ao facto das micotoxinas se distribuírem de forma bastante heterogénea nos produtos alimentares sólidos (9).

Deste modo, é fundamental estabelecer procedimentos de amostragem adequados, de modo a obter amostras representativas, minimizando assim a ocorrência de falsos resultados.

Actualmente existem planos de amostragem desenvolvidos por alguns organismos internacionais, destinados a garantir que se obtêm amostras representativas. Alguns destes planos são muito eficazes em termos de protecção da saúde na medida em que

reduzem ao mínimo a existência de falsos negativos, enquanto que outros são mais eficazes na redução de falsos positivos. O plano de amostragem ideal será aquele que minimiza o risco associado a estes dois tipos de planos (63).

Para que os resultados da análise de micotoxinas a nível europeu sejam comparáveis, foi elaborado o Regulamento (CE) 401/ 2006 de 23 de Fevereiro (119) o qual estabelece os critérios de amostragem e da avaliação do desempenho dos métodos analíticos para a determinação destas micotoxinas em géneros alimentícios, incluindo a patulina. Este regulamento apresenta os métodos de amostragem para os diferentes grupos de géneros alimentícios e para cada grupo indica o método particular de amostragem, indica também o número mínimo de amostras elementares a colher do lote, a amostragem na fase de venda a retalho e a aceitação do lote ou sublote.

O Regulamento 401/2006 considera, no âmbito da amostragem para a determinação de patulina em géneros alimentícios, dois grupos de produtos, que correspondem a dois métodos de amostragem diferentes. Um dos grupos inclui sumos de fruta e sidra e o outro inclui, produtos sólidos à base de maçã, sumo de maçã e produtos sólidos à base de maçã, destinados a lactentes e crianças jovens.

Para o primeiro grupo, sumos de fruta e sidra, a amostra global é de, no mínimo, 1 litro, a menos que tal não seja possível, por exemplo, quando se proceder à amostragem de uma única garrafa.

O número mínimo de amostras elementares a colher do lote depende da forma como os produtos em questão são habitualmente comercializados (tabela III.2). No caso de produtos líquidos comercializados a granel, o lote deve, na medida do possível, ser cuidadosamente misturado e de forma a não afectar a qualidade do produto, quer manual quer mecanicamente, imediatamente antes da colheita da amostra. Nestas condições pode pressupor-se que a distribuição de patulina num determinado lote é homogénea. É por conseguinte suficiente colher três amostras elementares de um lote a fim de constituir uma amostra global (119).

Na fase de venda a retalho, a amostragem deve ser efectuada como acima referido. Caso tal não seja possível pode aplicar-se um método de amostragem alternativo, desde que a amostra global seja representativa do lote amostrado e o método esteja integralmente descrito e documentado.

Tabela III.2: Número mínimo de amostras elementares a colher do lote (líquidos) (119).

Forma de comercialização	Volume lote (L)	Nº mín. amostras a recolher	Vol. mín. amostra global (L)
Granel (sumo fruta, bebida espirituosas, sidra, vinho)	---	3	1
Garrafas/embalagens (sumos de frutas, bebidas espirituosas, sidra)	≤ 50	3	1
Garrafas/embalagens (sumos de frutas, bebidas espirituosas, sidra)	50 a 500	5	1
Garrafas/embalagens (sumos de frutas, bebidas espirituosas, sidra)	> 500	10	1

Aceita-se o lote caso a amostra respeite o limite máximo, tendo em conta a correcção em função da recuperação e a incerteza de medição. Rejeita-se o lote se a amostra exceder o limite máximo, com um grau de confiança elevado, tendo em conta a correcção em função da recuperação e a incerteza de medição (119).

Para o segundo grupo, produtos sólidos à base de maçã, sumo de maçã e produtos sólidos à base de maçã, destinados a lactentes e crianças jovens, a amostra global é, no mínimo, 1 kg, a menos que tal não seja possível, por exemplo, quando se proceder à amostragem de uma única embalagem.

O número mínimo de amostras elementares a colher do lote encontra-se indicado na tabela III.3. No caso de produtos líquidos, o lote deve ser cuidadosamente misturado, na medida do possível, quer manual quer mecanicamente imediatamente antes da colheita da amostra. Nestas condições pode pressupor-se que a distribuição de patulina num determinado lote é homogénea. É por conseguinte suficiente colher três amostras elementares de um lote a fim de constituir uma amostra global.

As amostras elementares deverão ter peso semelhante. Uma amostra elementar deve pesar, no mínimo 100 gramas, dando origem a uma amostra global de, pelo menos, cerca de 1 kg.

Tabela III.3: Número mínimo de amostras elementares a colher do lote (sólidos) (119).

Peso do lote (kg)	Nº mín. amostras elementares a recolher	Peso da amostra global (kg)
< 50	1	1
50 a 500	5	1
> 500	10	1

Caso o lote seja constituído por embalagens individuais, o número de embalagens necessárias para formar a amostra global depende do número total de embalagens ou unidades do lote (tabela III.4).

Tabela III.4: Número de embalagens (amostras elementares) necessárias para formar a amostra global caso o lote seja constituído por embalagens individuais (119).

Nº embalagens ou unidades no lote	Nº embalagens ou unidades	Peso da amostra global (kg)
1 a 25	1 embalagem ou unidade	1
26 a 100	Cerca de 5%, com um mínimo de 2 embalagens ou unidades	1
> 100	Cerca de 5%, com um máximo de 10 embalagens ou unidades	1

Na fase de venda a retalho a amostragem deve ser efectuada como acima referido. Caso tal não seja possível pode aplicar-se um método de amostragem alternativo, desde que a amostra global seja representativa do lote amostrado e o método esteja integralmente descrito e documentado.

Tal como descrito para o primeiro grupo, aceita-se o lote caso a amostra respeite o limite máximo, tendo em conta a correcção em função da recuperação e a incerteza de medição. Rejeita-se o lote se a amostra exceder o limite máximo, com um grau de confiança elevado, tendo em conta a correcção em função da recuperação e a incerteza de medição.

O anexo II do Regulamento 401/2006 estabelece ainda critérios aplicáveis à preparação das amostras e aos métodos de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios (119).

Apresentam-se na tabela III.5 os critérios de desempenho definidos no Regulamento 401/2006 para a determinação de patulina em géneros alimentícios.

Tabela III.5: Critérios de desempenho dos métodos de análise da patulina (119).

Teor ($\mu\text{g/kg}$)	RSD_r %	$\text{RSD}_R\%$	Recuperação (%)
< 20	≤ 30	≤ 40	50 - 120
20 - 50	≤ 20	≤ 30	70 - 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 - 105

RSD_r : Desvio padrão relativo, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de repetibilidade.

RSD_R : Desvio padrão relativo, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de reprodutibilidade.

Ainda de acordo com o referido regulamento, se a legislação comunitária não exigir um método específico para a determinação dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios, os laboratórios podem seleccionar um método, desde que ele cumpra os critérios de desempenho descritos para as várias micotoxinas.

Assim, o método analítico utilizado pelos laboratórios oficiais para a vigilância e controlo dos níveis de micotoxinas em produtos alimentares, deve ser alvo de um protocolo de validação, para demonstrar que produz resultados analíticos fiáveis e obedece aos critérios de desempenho definidos no Regulamento (CE) 401/2006 (119).

.

Capítulo IV - Metodologia analítica

1. Generalidades

As micotoxinas são compostos com diferentes estruturas químicas, os quais, podem contaminar uma grande diversidade de alimentos, com níveis de concentração bastante variáveis. Por outro lado, a toxicidade das micotoxinas está associada à sua presença nos alimentos em concentrações baixas (na ordem dos $\mu\text{g/kg}$). Todos estes factores contribuem para a necessidade de desenvolver métodos analíticos selectivos e sensíveis.

De um modo geral os métodos utilizados na determinação das micotoxinas envolvem uma fase de preparação da amostra, que inclui a extracção e purificação dos analitos, e uma fase de determinação que, na maioria das vezes, consiste na utilização de métodos cromatográficos, nomeadamente métodos de cromatografia líquida e cromatografia gasosa acoplada a vários tipos de detectores, para separar, quantificar e identificar os compostos em estudo.

Os métodos analíticos utilizados para a determinação de micotoxinas devem possuir limiares analíticos suficientemente baixos (geralmente na gama de $\mu\text{g/kg}$ para a maioria das micotoxinas ou ng/kg no caso da aflatoxina M_1 no leite), devem ser específicos para evitar interferências analíticas, devem ser facilmente aplicados nos laboratórios de rotina e devem ser pouco dispendiosos (120).

Referem-se em seguida, de forma resumida, alguns aspectos relacionados com os métodos de preparação e quantificação da amostra, incidindo especialmente na extracção em fase sólida e nos métodos cromatográficos aplicados à determinação de patulina.

2. Amostragem

Os fungos produtores de micotoxinas distribuem-se geralmente de forma heterogénea, dando origem a zonas com concentração em toxina muito diferentes, muito elevada numas zonas e de menor concentração noutras. Deste modo, é importante estabelecer um plano de amostragem que garanta que a amostra colhida é representativa do produto em análise, o que por vezes pode ser bastante difícil. A amostragem é um

aspecto fundamental da determinação das micotoxinas podendo contribuir de forma significativa para o erro associado à sua determinação (10).

A amostragem é um processo que consiste em retirar uma parte que se pretende representativa, de um material, de forma a serem examinadas certas características, ou seja, um processo de selecção de material para análise (amostra), que represente a quantidade definida de produto (lote) (121).

A amostragem desempenha um papel extremamente importante na qualidade do resultado analítico, em especial devido à distribuição heterogénea da contaminação dos alimentos com micotoxinas, sendo este um factor importante a considerar no estabelecimento de critérios de amostragem.

Enquanto que nas amostras líquidas se assume que as micotoxinas presentes se distribuem de forma homogénea, nos produtos alimentares sólidos nem sempre isto acontece. Certas micotoxinas, em particular as produzidas por *Aspergillus* (caso das aflatoxinas) podem distribuir-se de forma bastante heterogénea em certos produtos alimentares, incluindo os amendoins, podendo concentrar-se em certas zonas de um lote, designadas por “hot spots”. Por vezes verifica-se que apenas um pequeno número de unidades se apresenta contaminado, mas o nível de contaminação por unidade pode ser bastante elevado (12).

No caso da análise de patulina em sumos (límpidos e turvos) e purés à base de maçã definiu-se um plano de amostragem, considerando que os purés e os sumos poderiam ser tratados como amostras líquidas, não apresentando portanto problemas de falta de homogeneidade na distribuição da contaminação.

Para efeitos de controlo oficial deve seguir-se o plano de amostragem definido no regulamento 401/2006, tal como apresentado nas tabelas III.2 e III.3 (119). No presente estudo não foi adoptado este plano de amostragem, mas sim um plano efectuado num estudo no Reino Unido (14), no qual as tomas são de 600 mL ou 600g para sumos e purés, respectivamente.

Foram adquiridas amostras de sumos e purés à base de maçã comercializados em Portugal, incluindo os produtos de fabrico nacional e os produtos importados de alguns países europeus. Seleccionou-se uma vasta gama de marcas e variedades de puré e sumo, tendo em consideração as marcas mais representadas nos diferentes estabelecimentos comerciais. Todos os produtos (sumos e purés à base de maçã) destinados à alimentação infantil foram incluídos sem excepção. As amostras foram adquiridas em supermercados, hipermercados, lojas de produtos biológicos, farmácias e outros locais de venda de produtos alimentares de Lisboa e da margem sul do Tejo

(Almada e Seixal). Adquiriu-se um número de unidades suficiente do mesmo lote para perfazer no mínimo 600 g de puré e 600 mL de sumo.

Um dos objectivos do presente estudo é a determinação de patulina em purés e sumos à base de maçã destinados a lactentes e crianças jovens.

O sumo de maçã é uma das bebidas mais consumidas por crianças em diversos países, particularmente nos Estados Unidos da América. Em Portugal não existem estudos que permitam estimar o consumo diário de sumo de maçã por parte da população infantil. No entanto, verifica-se que o sumo de maçã é dado às crianças, de forma despreocupada, a partir do momento em que estas adoptam uma alimentação semelhante à dos adultos (a partir dos 12 meses).

Deste modo, além destes alimentos destinados a lactentes e crianças jovens incluíram-se também no estudo, os sumos à base de maçã destinados aos consumidores em geral, devido ao facto de existirem poucas marcas e pouca variedade de sumos de maçã destinados exclusivamente à população infantil, presumindo-se que, por isso, as crianças consumam para além dos sumos específicos para o seu grupo etário, outros tipos de sumos, incluindo os destinados aos consumidores em geral.

3. Métodos de preparação da amostra

A fase de preparação da amostra envolve uma ou mais etapas do método influenciando de forma significativa o resultado final. Para a maioria dos métodos de determinação de micotoxinas, o passo de preparação de amostra, envolve procedimentos de extracção e purificação, os quais, são geralmente demorados e representam cerca de dois terços do tempo total da análise (10).

Na análise cromatográfica, a preparação da amostra tem três grandes objectivos (122-124):

- Transferir o analito em estudo da matriz original, para uma forma mais adequada, que seja compatível com o sistema analítico.
- Reduzir ou eliminar os interferentes da matriz.
- Concentrar o analito de forma a obter uma concentração adequada ao sistema de medição.

A técnica utilizada na preparação da amostra depende essencialmente da complexidade da matriz, das propriedades do composto a analisar, em particular da sua volatilidade,

polaridade e solubilidade, da concentração do analito na amostra e da metodologia analítica utilizada. Há ainda a considerar outros factores, nomeadamente, os custos, a facilidade de automatização e o tempo de análise.

Actualmente, a selecção da técnica de preparação da amostra baseia-se em critérios, quer de eficiência do método, quer do seu impacte ambiental. Nesta perspectiva, têm surgido novos conceitos aliados a metodologias que recorrem a menores quantidades de solventes orgânicos, igualmente eficientes, de menor impacte ambiental e de menor risco para a saúde pública.

As técnicas de preparação da amostra aplicadas à análise de micotoxinas e em particular as que são utilizadas na determinação de patulina em alimentos baseiam-se essencialmente na extracção líquido-líquido (LLE) (56, 60, 61, 72, 76, 77) e na extracção em fase sólida (SPE) (62, 68, 71, 74). Recentemente foi publicada uma outra técnica de preparação de amostras para análise de patulina designada por dispersão em fase sólida (MSPD) (125).

3.1. Extracção em fase líquida (LLE)

A extracção líquido-líquido (LLE) foi durante décadas a técnica de eleição para a análise de diversos compostos em matrizes alimentares. No caso específico da patulina, a LLE é a técnica de preparação da amostra mais documentada (54, 56, 57, 60, 61, 66, 72, 73, 76, 77, 126-130). A LLE baseia-se na distribuição ou partição de um ou mais solutos, entre duas fases líquidas. No caso particular dos alimentos, a LLE baseia-se na partição de compostos orgânicos entre a amostra aquosa e um solvente orgânico imiscível. Nesta metodologia explora-se a diferente solubilidade dos compostos nos solventes aquosos e orgânicos, extraíndo o(s) analito(s) para um dos solventes e deixando os restantes compostos da matriz (interferentes) no outro solvente. A eficiência da extracção depende do tipo de analito, do solvente da amostra, do volume de solvente utilizado na extracção, do número de extracções efectuadas, da razão água:solvente, do pH e da força iónica da amostra.

O solvente é um dos principais factores que afectam o rendimento extractivo ou eficiência da extracção e a sua selecção depende de (123):

- Imiscibilidade com a amostra.
- Solubilidade dos analitos e respectivos metabolitos.
- Solubilidade de outros componentes da amostra (co-extractivos).
- Grau de pureza.

- Toxicidade.
- Custo e alternativa mais barata.
- Custos de eliminação e/ou dificuldades.
- Facilidade de concentração.
- Compatibilidade com o método analítico usado.

Actualmente e sempre que possível, a LLE tem vindo a ser substituída por outras técnicas devido ao facto de ser necessário recorrer a elevados volumes de solventes orgânicos, ser pouco adequado para analitos polares ou iónicos, requerer um passo de concentração, ser difícil de automatizar e por poder dar origem à formação de emulsões.

Apesar das desvantagens acima descritas, a LLE é uma técnica de preparação de amostra bastante utilizada. Refere-se como exemplo, o procedimento descrito na Norma Europeia EN 14177 de 2003 (“Foodstuffs-Determination of patulin in clear and cloudy apple juice and puree- HPLC method with liquid/liquid partition clean-up”) (131) que envolve a extracção líquido-líquido da patulina com acetato de etilo seguida de um passo de remoção de compostos acídicos interferentes, utilizando uma solução de carbonato de sódio, e posterior análise por HPLC-UV (131). Este método de extracção tem sido utilizado por diversos autores, na determinação da patulina em produtos alimentares (57, 76, 77).

3.2. Extracção em fase sólida (SPE)

A extracção em fase sólida é uma técnica de preparação de amostras amplamente utilizada na actualidade. O seu domínio de aplicação é bastante diversificado, incluindo entre outras, as amostras alimentares (37), clínicas (132), ambientais (133) e toxicológicas (134).

A SPE aplica-se à análise de compostos semi-voláteis e não voláteis e é uma técnica de preparação da amostra utilizada com frequência na análise de micotoxinas em amostras de alimentos. Nos últimos anos, a extracção em fase sólida tem vindo a substituir muitos dos métodos clássicos de análise de micotoxinas, baseados principalmente na extracção em fase líquida.

A extracção em fase sólida é uma técnica de preparação de amostras que se baseia em princípios semelhantes aos da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e é utilizada para a adsorção selectiva de analitos ou interferentes presentes em matrizes

simples ou complexas (135). É usada como técnica de purificação de amostras e/ou concentração de analitos na fase do método que precede a determinação por HPLC, GC ou outra técnica separativa.

Na sua forma mais simples, a SPE utiliza um material sólido adsorvente como é o caso da sílica ligada ou de certos polímeros, contidos no interior de seringas, discos ou pontas de pipetas. Genericamente, a retenção ocorre fazendo passar a solução que contém o(s) composto(s) em estudo, através da fase sólida porosa e posterior eluição, através da passagem de solvente (eluente).

Relativamente à técnica de LLE, a SPE apresenta várias vantagens (124, 135, 136) incluindo:

- Elevada simplicidade de execução.
- Redução do tempo de preparação da amostra.
- Menor consumo de solventes orgânicos nocivos e dispendiosos.
- Menor volume de amostra.
- Melhor ajuste da selectividade escolhendo uma fase estacionária apropriada.
- Possibilidade de automatização “on line ou “off line”
- Evita a formação de emulsões.

Regra geral, a aplicação da técnica de SPE permite ainda obter extractos mais limpos e recuperações mais elevadas (135).

No entanto, apresenta algumas desvantagens, nomeadamente (124):

- Entupimento ou colmatção da camada adsorvente por componentes sólidos ou gordurosos presentes na amostra.
- Extracção apenas dos analitos dissolvidos em solventes aquosos.
- Elevada variabilidade, resultante de diferenças de capacidade adsorvente entre diferentes lotes de material.
- “Breakthrough” ou limitação da capacidade extractiva do material adsorvente (quando a concentração do ou dos analitos é muito elevada).

3.2.1. Desenvolvimento de um método de SPE

Uma boa definição das condições de SPE é determinante para o sucesso da preparação da amostra. No desenvolvimento de um método de extracção por SPE é importante que,

para além de definir o objectivo, se tenha em consideração os factores que afectam a separação dos componentes da amostra. Esses factores estão relacionados não só com o processo extracção, mas também com os compostos em estudo. Os factores que mais influenciam a eficiência do método de SPE são (124):

- O tipo de adsorvente (relacionado com a polaridade dos componentes a separar).
- A capacidade do dispositivo de SPE (relacionado com o volume de amostra).
- Os solventes utilizados nos vários passos do processo (dissolução da amostra, condicionamento, lavagem e eluição).
- A quantidade de adsorvente (adequada à retenção completa do ou dos analitos em estudo).

No âmbito dos factores relacionados com os compostos em estudo é fundamental conhecer, entre outros, a natureza química, a polaridade, a acidez/basicidade e a solubilidade dos compostos a separar.

3.2.2. Adsorventes em SPE e mecanismos de retenção

No estudo do método de SPE, a selecção do tipo de enchimento baseia-se no objectivo a atingir, na natureza da amostra e nas propriedades do analito de interesse. Existe uma vasta gama de materiais de enchimento, que podem ser utilizadas no fabrico de fases sólidas para SPE (122). Enquanto que alguns destes materiais são de origem natural, como o carvão grafitizado, a terra de diatomáceas, a alumina, a sílica, a sílica ligada, o silicato de magnésio (florisil) e a celulose, outros são polímeros sintéticos, como é o caso do poliestireno-divinilbenzeno e do poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona). Estes últimos possuem um elevado grau de porosidade que lhes confere uma maior superfície activa real, permitindo uma maior capacidade de adsorção. Estes polímeros de nova geração permitem extrair uma grande variedade de analitos independentemente da sua natureza, quer sejam ácidos, básicos e neutros, quer sejam polares ou apolares, sendo por vezes designados por HLB (Hydrophilic-Lipophilic-Balance)(122, 137, 138).

A sílica gel é um material frequentemente usado como adsorvente em SPE (122). A superfície da sílica possui grupos silanol, os quais, podem estabelecer ligações com os compostos alvo através de múltiplas interacções electrostáticas. A presença de grupos Si-OH livres confere à sílica um carácter bastante polar (137).

Cada adsorvente apresenta características próprias para reter os analitos, através de diversos tipos de interacções moleculares que se estabelecem entre a fase estacionária,

a fase móvel e os compostos em causa. Os tipos de interacção estabelecida entre o analito e o material adsorvente podem dividir-se em quatro grupos (137, 138):

- Adsorção
- Interacções apolares, hidrofóbicas ou de fase reversa
- Interacções polares, hidrofílicas ou de fase normal
- Interacções iónicas.

A adsorção estabelece-se entre as moléculas do analito e as partículas sólidas do enchimento. A quantidade total de moléculas adsorvidas é proporcional ao valor de superfície total do adsorvente, razão pela qual este deverá ser finamente dividido. Os principais tipos de enchimento que actuam desta forma são a sílica, o carvão grafitizado, a terra de diatomáceas, a alumina e o florisil. As interacções são do tipo hidrofóbico ou hidrofílico consoante o tipo de enchimento usado (137).

As interacções apolares, hidrofóbicas ou de fase reversa ocorrem essencialmente devido a forças de van der Waals. Estabelecem-se entre as ligações carbono-hidrogénio do analito e as do grupo funcional do enchimento. Neste caso, utiliza-se geralmente como enchimento a sílica modificada, ligada a um derivado de um alcano de cadeia longa (adsorvente do tipo C_{18}) e também os copolímeros divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona. A retenção é favorecida pelos solventes polares enquanto a eluição dos analitos é favorecida pela utilização de solventes apolares. É geralmente aplicada em matrizes aquosas para extracção de analitos de polaridade moderada a apolares (137).

As interacções polares, hidrofílicas ou de fase normal incluem especialmente ligações por pontes de hidrogénio e ligações dipolo-dipolo, as quais podem ocorrer entre diversos tipos de enchimento e os grupos funcionais do analito. Este tipo de interacção é utilizado para a extracção de compostos de média a elevada polaridade. A retenção é facilitada pela utilização de um solvente apolar e a eluição é melhorada através da utilização de solventes polares (122, 137, 138).

Os principais tipos de enchimento que apresentam este tipo de comportamento são a alumina e o florisil. A sílica pode também ser utilizada, directamente ou após modificação mediante ligações com grupos cianopropilo (CN), diol (2OH) e aminopropilo (NH_2), que lhe confere características de polaridade intermédia, polaridade elevada e variável, respectivamente. Devido à sua versatilidade também podem ser usados os copolímeros divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona. De entre as várias aplicações possíveis para este tipo de adsorventes destaca-se a utilização da cianopropil-sílica (polaridade intermédia) na extracção de compostos extremamente apolares uma vez que os

compostos deste tipo ficam irreversivelmente ligados a adsorventes apolares do tipo Si - C₁₈. Os adsorventes do tipo diol são polares e são muito utilizados na extracção de compostos polares dissolvidos em solventes pouco polares. Os adsorventes do tipo NH₂ são polares e são muito úteis para a separação de isómeros estruturais, sendo utilizados com frequência na purificação de amostras de origem biológica (122, 137, 138).

As Interacções iónicas ocorrem por atracção electrostática entre um analito carregado, positiva ou negativamente, e um enchimento de carga oposta. Este tipo de interacção pode ser dividido em duas classes, a catiónica e a aniónica. Os principais enchimentos são o carboximetil e trimetilaminopropil utilizados para os analitos que se apresentam sob a forma ionizada, em soluções aquosas de baixo teor salino (137, 138).

A tabela IV.1 apresenta de forma resumida os vários tipos de adsorvente utilizados em SPE.

Tabela IV.1: Material adsorvente utilizado em SPE (121).

Fases apolares		Fases polares	
C18	Octadecilo	CN	Cianopropil
C8	Octilo	2OH	Diol
C2	Etilo	SiOH	Silica
CH	Ciclohexilo		
PH	Fenilo		
Fases poliméricas		Fases de troca iónica	
PLRP-S		CBA	Troca catiónica (fraca)
Lichrolut EN		NH ₂	Troca aniónica (fraca)
Isolute ENV		SCX	Troca catiónica (forte)
SDB		SAX	Troca aniónica (forte)
Oásis HLB			

Nos últimos anos foram desenvolvidas colunas de SPE de imunoafinidade, as quais, contêm anticorpos específicos para o analito em estudo, permitindo uma retenção mais selectiva e uma purificação mais eficaz. As colunas de imunoafinidade (IAC's - "immunoaffinity columns") contêm anticorpos imobilizados que retém exclusivamente uma determinada micotoxina ou classe de micotoxinas (12). Devido à sua elevada especificidade, as IAC's dão origem a extractos mais limpos, com níveis reduzidos de

interferentes e com uma excelente relação sinal ruído, quando comparado com os resultados obtidos com as colunas SPE compostas por materiais menos selectivos. As IAC's têm sido desenvolvidas para a análise de muitas micotoxinas incluindo aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenos e zearalenona (12).

Na SPE, além das colunas de imunoafinidade, utilizam-se também com frequência as colunas MycoSep. O material de enchimento é diferente de coluna para coluna. Todas contêm uma mistura de compostos polares e apolares que têm a capacidade de remover os principais interferentes dos alimentos, nomeadamente, proteínas, hidratos de carbono, ácidos gordos e corantes. Este tipo de colunas permite que a toxina ou grupo de toxinas passe através da coluna, praticamente sem ser adsorvida, sendo possível obter recuperações superiores a 80% (139).

3.2.3. Procedimentos gerais de preparação de amostras utilizando SPE

A SPE pode ter diferentes objectivos, nomeadamente, a extracção ou concentração de analitos ou a remoção de interferentes da matriz. Pode ainda usar-se de forma combinada, isto é, para a extracção dos analitos e para a remoção dos interferentes.

No primeiro caso, o procedimento consiste na retenção dos analitos na fase sólida, enquanto que os interferentes presentes na matriz são eliminados por lavagem da coluna com solvente apropriado. Após a eliminação dos interferentes, os analitos retidos são eluídos, usando um solvente diferente, e recolhidos para posterior análise (122, 124).

No segundo modo, há retenção selectiva dos interferentes na fase sólida enquanto que os analitos são eluídos e recolhidos para posterior análise.

Estes dois processos podem ser utilizados em simultâneo com o objectivo de purificar a amostra. Neste caso, procede-se à retenção do analito e de outros compostos da matriz no material adsorvente. A lavagem posterior do material adsorvente elimina parte dos compostos da matriz, à excepção dos analitos. Por fim, elui-se o analito da coluna, enquanto que a outra parte dos componentes da matriz se mantém retida na fase sólida (124).

A utilização da SPE com o objectivo de concentrar a amostra segue um procedimento idêntico. Neste caso, após passagem de um determinado volume de amostra (normalmente elevado), os analitos presentes numa amostra em quantidades reduzidas vão ficar retidos na fase sólida. Em seguida, os analitos retidos são eluídos utilizando

um volume reduzido de outro solvente, obtendo-se uma solução final mais concentrada nesses analitos (124).

Regra geral, a extracção em fase sólida processa-se em quatro etapas: condicionamento, aplicação da amostra, lavagem/secagem e eluição (Figura IV.1).

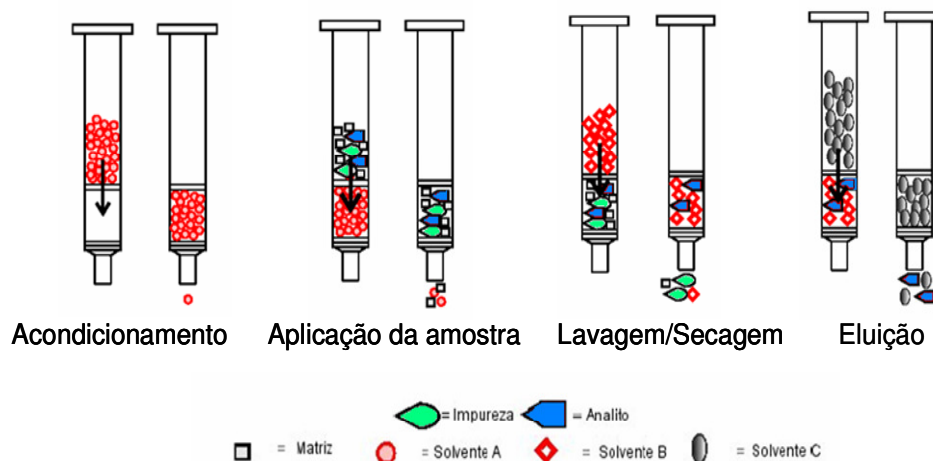


Figura IV.1: Etapas da técnica SPE (condicionamento, aplicação da amostra, lavagem/secagem do adsorvente e eluição) (124).

Descrevem-se em seguida os passos gerais do procedimento de extracção em fase sólida, para o modo em que há retenção do analito (A) e para o modo em que ocorre retenção dos interferentes (B).

(A) Modo de “retenção do(s) analito(s) (124, 135)”

- Condicionamento do material adsorvente. Este passo tem como objectivo activar ou solvatar o enchimento de modo a favorecer a sua interacção com os componentes da amostra. No caso de colunas de fase reversa o condicionamento com um solvente orgânico como metanol ou acetonitrilo é importante para obter resultados reprodutíveis. Na ausência de condicionamento, o solvente da amostra, que é geralmente aquoso, não consegue penetrar nos poros do adsorvente e molhar a sua superfície. Por esta razão apenas uma pequena parte da superfície do adsorvente fica disponível para interagir com o analito. Pela mesma razão é importante não deixar secar o adsorvente entre o condicionamento e a aplicação da amostra.

- b) Aplicação da amostra. É nesta fase, de passagem através do adsorvente, que ocorre a retenção do ou dos analitos. Deve controlar-se a quantidade de amostra aplicada e também o fluxo de passagem através do adsorvente para evitar o equilíbrio incompleto entre os analitos e o adsorvente.
- c) Limpeza do material adsorvente. Este passo tem com objectivo a remoção de eventuais interferentes da matriz. Esses interferentes são removidos por passagem de um solvente de lavagem através da fase sólida.
- d) Secagem para remoção total do solvente de lavagem.
- e) Eluição dos compostos em estudo retidos no enchimento, seleccionando um solvente de polaridade adequada e que tenha a capacidade de quebrar as interacções analito-adsorvente e garanta a eluição dos analitos.

(B) Modo “retenção dos interferentes” (124)

- a) Fase de condicionamento (que pode não existir).
- b) Aplicação da amostra. É nesta fase de passagem através do adsorvente que ocorre a retenção dos interferentes enquanto os compostos em estudo atravessam a fase sólida sem ser retidos.
- c) Limpeza do adsorvente, com solvente de lavagem, para arrastar pequenas quantidades de amostra que estejam ainda presentes na coluna.
- d) Secagem do adsorvente para recolher o restante solvente de lavagem, que pode conter uma pequena quantidade de amostra.

3.2.4. Selecção de solventes

Os solventes em SPE são utilizados nas etapas de condicionamento, lavagem e eluição. Deste modo, a sua utilização tem diversas finalidades, tais como (140):

- Condicionar a fase sólida.
- Dissolver a amostra a processar e transportar os solutos, favorecendo a sua adsorção.
- Eliminar material indesejável presente no enchimento, por lavagem, sem eluir o ou os analitos.
- Eluir os compostos a analisar, removendo-os da fase sólida, sem eluir os componentes da matriz.

A escolha destes solventes obedece a vários critérios. Um deles é que ele seja compatível (miscível ou, pelo menos, solúvel, sem interagir quimicamente) com outros solventes usados previamente no processo de SPE.

A escolha do solvente adequado para a retenção do composto no sistema de SPE segue o princípio do “like-to-like” aplicado à solubilidade dos compostos, ou seja, igual dissolve igual (122). Uma mistura de solventes polar como por exemplo água e metanol ou água e acetonitrilo contendo como solutos compostos orgânicos pouco polares, na presença de uma fase estacionária apolar (C_{18} , C_8 , etc.) dará origem à retenção dos solutos no material adsorvente. A eluição com hexano ou com outro solvente hidrofóbico irá permitir a remoção desses compostos (122, 140).

Um dos aspectos a considerar durante o processo de SPE é a eventual mistura indesejável de solventes quando se passa do processo de retenção para o processo de eluição, podendo levar à formação de emulsões. Para eliminar esta possibilidade é necessário proceder à secagem completa da fase sólida após a lavagem e antes da eluição. No caso de não se efectuar a secagem completa do adsorvente, o resultado será um extracto “molhado”, o qual poderá diminuir o rendimento do processo e consequentemente afectar negativamente os resultados. Este problema deve-se ao facto de, a adsorção ser feita regra geral com solventes aquosos e a eluição com solventes orgânicos. Se a água não for eliminada, diminui-se a capacidade de eluição e consequentemente o rendimento extractivo. Por outro lado, um extracto orgânico com elevado teor de água leva mais tempo a evaporar, há a necessidade de aumentar a temperatura e/ou tempo de evaporação, os quais, também conduzem a diminuições do rendimento extractivo (122, 140).

3.3. Dispersão em fase sólida (MSPD)

A técnica de preparação de amostra por dispersão em fase sólida, MSPD (“Matrix Solid Phase Dispersion”) aplica-se particularmente na análise de amostras sólidas e semi-sólidas, tendo sido utilizada por Wu e colaboradores (125) para a determinação de patulina em concentrado de sumo de maçã e em maçãs. Na preparação de amostras por MSPD a amostra é dispersa de forma homogénea num suporte sólido, geralmente sílica C_{18} ou C_8 , criando-se assim uma fase cromatográfica específica que é depositada no interior de uma coluna, sendo utilizada como fase estacionária. Os compostos presentes nesta fase estacionária são posteriormente extraídos e purificados utilizando solventes apropriados. No caso particular da análise de patulina, os autores descrevem um

procedimento que envolve a mistura de 0,5 g de amostra com 2 g de adsorvente do tipo C₁₈. Estes dois componentes são cuidadosamente misturados e colocados no interior do corpo de uma seringa, formando assim uma coluna semelhante às utilizadas em SPE, mas com um enchimento único, contendo a amostra a analisar. Esta coluna é lavada com n-hexano e em seguida a patulina é eluída com diclorometano. Evapora-se e redissolve-se o resíduo com ácido acético. Wu e colaboradores compararam este método com o de LLE e referem que a MSPD apresenta várias vantagens, tais como, a possibilidade de utilizar menor quantidade de amostra e de solventes orgânicos, melhor recuperação, extracção mais rápida e fácil, sendo também menos prejudicial para o meio ambiente. Os resultados obtidos indicam que a MSPD pode ser utilizada na determinação de patulina em alimentos, tendo sido obtida uma recuperação que varia entre 90% e 103% para concentrado de sumo de maçã e entre 85% e 98% para maçã (125).

4. Métodos de determinação de micotoxinas em alimentos

Os métodos analíticos inicialmente utilizados na determinação de micotoxinas em géneros alimentícios baseavam-se essencialmente na cromatografia em camada fina (TLC). Apesar de esta técnica ter sido em muitos casos substituída por outras técnicas cromatográficas, ainda se aplica com alguma frequência na determinação de aflatoxinas, em particular nos países em vias de desenvolvimento (120).

Actualmente, os métodos mais utilizados na quantificação de micotoxinas em alimentos para humanos e animais incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada a vários tipos de detectores, nomeadamente, detector de ultravioleta (HPLC-UV), detector de fluorescência (HPLC-FL) ou espectrometria de massa (LC-MS) e a cromatografia gasosa acoplada a vários detectores tais como o de ionização de chama (GC-FID), de captura electrónica (GC-ECD) ou de massa (LC-MS) (12, 37). Como estes métodos instrumentais são geralmente dispendiosos foram desenvolvidos outros métodos, designados por “métodos rápidos” mais simples e fáceis de executar. Estes métodos têm sido amplamente desenvolvidos nos últimos 10 anos. Um deles é o “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) utilizado maioritariamente no rastreio de micotoxinas em produtos alimentares (12, 37).

A cromatografia líquida ou gasosa acoplada à detecção por espectrometria de massa tem tido uma utilização crescente nos últimos anos. Estes métodos permitem não só identificar inequivocamente os compostos em análise, mas também, determinar em simultâneo várias micotoxinas presentes numa mesma matriz. Devido à sua elevada selectividade e sensibilidade, é possível por vezes, simplificar o passo de purificação, injectando-se extractos pouco limpos directamente no sistema (12, 37).

Vão ser apresentados de forma sucinta os métodos analíticos geralmente utilizados na determinação de algumas micotoxinas ou grupos de micotoxinas. Os métodos de determinação da patulina serão referidos de forma mais detalhada na secção 4.2 do presente capítulo.

4.1. Análise de micotoxinas

A determinação das aflatoxinas, particularmente a B₁, efectua-se na maioria dos casos por HPLC-FL com derivatização pós-coluna e purificação por coluna de imunoafinidade (10, 11, 37, 141, 142). Existem ainda diversos métodos rápidos, incluindo ELISA e TLC (143), que podem ser utilizados como métodos de rastreio para pesquisa de aflatoxinas em alimentos (10, 11, 37).

A determinação de fumonisinas efectua-se por HPLC e envolve geralmente um passo de purificação com colunas de imunoafinidade, uma fase de derivatização, uma vez que estes compostos não são naturalmente fluorescentes, e a análise por HPLC de fase reversa com detecção por fluorescência (10, 11, 144, 145). Os métodos de rastreio habitualmente utilizados incluem a cromatografia em camada fina e ELISA (10, 11, 37). Nos últimos anos têm sido desenvolvidos métodos de LC-MS que se aplicam principalmente à determinação de fumonisina B₁ em diversos alimentos, por ser a mais frequente e a que apresenta maior actividade promotora de cancro (34).

Sendo um composto naturalmente fluorescente a determinação analítica da ocratoxina A (OTA) faz-se essencialmente por HPLC-FL, após passagem por colunas de SPE (imunoafinidade ou sílica, entre outras) para purificação das amostras (10, 11, 34, 37, 142, 144). Utilizam-se também métodos imunoenzimáticos (ELISA) e de TLC para separação e detecção desta micotoxina (10, 11). Têm sido desenvolvidos nos últimos anos alguns métodos de LC-MS, vocacionados para identificação e quantificação de ocratoxina A em alimentos e em amostras de origem biológica (34).

Existem actualmente diversos métodos publicados para determinação de tricotecenos (146), em particular para pesquisa de DON em alimentos (37), utilizando-se com frequência TLC e ELISA como técnicas de rastreio (10, 37, 63). Os métodos de confirmação baseiam-se principalmente em GC-MS ou GC-ECD, após purificação com colunas de SPE (colunas de imunoafinidade e Mycosep, entre outras) (10, 11, 34). Existem, no entanto, descritos outros métodos de confirmação incluindo HPLC-UV de fase reversa e métodos de HPLC-FL com derivatização pós-coluna (63). Têm sido desenvolvidos nos últimos anos métodos de LC-MS ou de LC-MS/MS para a determinação de vários tricotecenos, incluindo o DON, em concentrações da ordem dos ppb, em certos alimentos, tais como, cereais em grão e flocos de milho (34).

Os métodos de rastreio para pesquisa de ZEA e dos seus metabolitos baseiam-se principalmente em imunoensaios (ELISA) e em TLC (10, 11, 37). No entanto devido a potenciais reacções cruzadas dos anticorpos com compostos da matriz é importante confirmar os resultados obtidos utilizando outras técnicas. Sendo a ZEA um composto naturalmente fluorescente, a sua determinação analítica faz-se preferencialmente por HPLC-FL de fase reversa, após purificação com colunas de SPE (imunoafinidade, florisil, MycoSep) (11, 37, 144). A descoberta de que todos os metabolitos da ZEA exibem propriedades estrogénicas semelhantes ou mais elevadas que a ZEA levou ao desenvolvimento de métodos de LC-MS/MS para a determinação de todos os metabolitos de ZEA formados *in vivo*, incluindo os alimentos, amostra biológicas e amostras ambientais (34).

A análise de 5 dos compostos pertencentes ao grupo dos alcalóides do Ergot (ergosina, ergotamina, ergocornina, ergocriptina e ergocristina) efectua-se na maioria das vezes por HPLC-FL após purificação por colunas de SPE do tipo C₁₈ (144). Encontram-se descritos outros métodos incluindo TLC e ELISA (10), usados principalmente no rastreio destes compostos e métodos mais complexos, utilizados como métodos de confirmação, tais como LC-MS e LC-MS/MS que permitem identificar inequivocamente os alcalóides presentes na amostra (12, 37).

4.2. Análise de patulina

Existem actualmente diversos métodos que podem ser utilizados para a determinação de patulina em diversos produtos alimentares. Os mais utilizados envolvem a extracção em fase sólida (SPE) ou a extracção líquido-líquido (LLE) seguida da análise por cromatografia líquida de alta resolução com detecção por ultravioleta (HPLC-UV).

A extracção de patulina por LLE efectua-se na maioria dos casos com acetonitrilo, seguida de evaporação e de dissolução do extracto em água a pH=4.

No caso da SPE utilizam-se colunas com determinados enchimentos específicos para a extracção e/ou purificação das amostras. Na análise de patulina podem ser utilizados diversos tipos de colunas de SPE, tais como, colunas de sílica (61, 147-150), colunas de fase reversa do tipo C₁₈ (74), colunas HLB, de natureza polimérica, (62, 136) e as colunas MycoSep 228 AflaPat (139, 151). Alguns artigos referem ainda a utilização de combinações de colunas com enchimentos diferentes na extracção de patulina e remoção de interferentes (62, 68).

Quando se utilizam colunas de sílica, há retenção dos interferentes e eluição da patulina. No caso de se utilizarem colunas do tipo C₁₈ (fase reversa), o processo envolve numa primeira fase a adsorção da patulina na fase sólida e a posterior eluição com solvente adequado.

As colunas de natureza polimérica do tipo HLB apresentam um mecanismo de retenção semelhante ao das colunas do tipo C₁₈ (62).

Os métodos analíticos inicialmente utilizados para a determinação de patulina em sumo de maçã baseavam-se na cromatografia em camada fina (TLC), a qual foi durante anos considerada como o método oficial da AOAC (“Association of Official Analytical Chemists”) (98). Anos mais tarde, surgiram os métodos baseados em HPLC e GC que vieram substituir quase por completo os métodos de TLC. Os métodos analíticos utilizados actualmente para determinação da patulina em sumo de maçã baseiam-se principalmente em HPLC de fase reversa com detector de ultravioleta-visível ou com detector de díodos (76, 129, 150-152). São também referidos outros métodos cromatográficos incluindo a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, GC-MS (153, 154), a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, LC-MS/MS e a cromatografia electrocinética micelar, MEKC (“Micelar Electrokinetic Chromatography”) (127).

Um dos primeiros métodos cromatográficos para a determinação de patulina em sumo de maçã, publicado por Tanner and Zanier em 1976, envolvia a extracção com acetato de etilo e subsequente purificação com uma solução de carbonato de sódio para eliminar potenciais interferentes fenólicos (98). Outros autores introduziram algumas alterações ao método de HPLC inicial e o método resultante, depois de optimizado, foi validado através de um estudo colaborativo organizado pela “AOAC International” para níveis de 25 µg/kg ou superiores, para a determinação de patulina em sumo límpido,

sumo turvo e puré de maçã (98). Este método foi adoptado pela AOAC (método 995.10) (126) e pelo CEN como Norma Europeia (EN 14177) (131). Este método foi posteriormente modificado de modo a permitir a determinação de patulina a níveis de 10 µg/Kg ou inferiores, tendo sido validado através de um estudo colaborativo organizado por Arranz e colaboradores (147).

Um dos aspectos particulares a ter em conta na determinação de patulina por HPLC-UV é a potencial interferência de certos compostos fenólicos, em particular, o 5-hidroximetilfurfural (HMF) que, no caso de se utilizarem colunas de fase reversa, pode eluir imediatamente antes da patulina, tornando-se essencial garantir uma boa separação entre estes dois compostos. A utilização de um sistema de detecção por díodos permite confirmar a presença de patulina através da análise do respectivo espectro, permitindo ainda confirmar a pureza do pico cromatográfico.

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos métodos de cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa de quadrupolo simples (LC-MS) (70) ou “tandem” (LC-MS/MS) (155), que se aplicam particularmente à determinação de níveis vestigiais de patulina, permitindo confirmar de forma inequívoca a sua presença na amostra analisada. A detecção por espectrometria de massa permite ainda ultrapassar as dificuldades de resolução cromatográfica por vezes encontradas na separação entre a patulina e o HMF. No caso de existir coeluição entre a patulina e o HMF, o detector de massa identifica e quantifica apenas os iões de massa correspondente à da molécula da patulina.

Nos últimos anos têm sido publicados alguns estudos de validação de métodos para a determinação de patulina por SPE-HPLC-UV em sumos de maçã (136, 152), em sumos de fruta (148) e em produtos à base de maçã destinados à alimentação infantil (147).

Existem ainda várias publicações que descrevem diferentes métodos para a análise de patulina em diversos géneros alimentícios, apresentando-se na tabela IV.2 alguns dos mais utilizados.

Tabela IV.2: Métodos utilizados na determinação de patulina em produtos alimentares.

Género Alimentício	País;Ano	Método	Referência
Alimentação infantil: sumo e puré de maçã	Holanda, 2005	SPE (C ₁₈ +Romer 224)/HPLC-DAD	(68)
	Tunísia; 2007	LLE/HPLC-DAD	(72)
	Itália; 2003-2004	LLE/HPLC-DAD	(76)
	Itália; 2003	LLE/ HPLC-DAD	(77)
Sumo de maçã convencional e biológico Mistura de sumo maçã e outros frutos	Bélgica, 2006	LLE-HPLC-UV	(60)
	Irão; 2001/2002	TLC	(69)
	Espanha, 2009	MEKC	(127)
	Itália; 2007	SPE(C ₁₈)/HPLC-DAD	(74)
	Espanha; 2007	LLE /HPLC-UV; GC-MS	(54)
	Reino Unido, 2000	LLE/HPLC-UV	(56)
	Japão, 2004	LC-MS	(70)
	China, 2007	SPE (MycoSep228)/HPLC-UV	(71)
Bebidas à base de maçã	Brasil, 2008	LLE/HPLC-DAD	(75)
Maçãs, sumos e purés de maçã	Itália, 2000	LLE/HPLC-UV	(61)
Concentrado de maçã ¹	Turquia; 2005	SPE (C ₁₈ ou HLB)/HPLC-DAD	(62)
Produtos à base de maçã	República Eslovaca, 2009	LLE/HPLC-DAD e UPLC-MS/MS	(155)

¹Todas as amostras foram reconstituídas (11,2-11,5° Brix) a partir do sumo concentrado.

5. Estudos da estabilidade da patulina

Antes de se validar o método analítico efectuaram-se alguns ensaios com o objectivo de estudar o efeito de alguns factores críticos inerentes à estabilidade da patulina. Estudou-se o efeito do pH, da temperatura de conservação das amostras, do tempo de conservação dos padrões e o efeito de diferentes condições de evaporação (temperatura, pressão de azoto e tempo de evaporação).

5.1. Efeito do pH

A maioria dos autores refere que a patulina é instável em meio alcalino, recomendando que o passo inicial de extracção em presença de hidrogenocarbonato de sódio seja efectuado tão rápido quanto possível para evitar perdas de composto (56). Considerando que o tempo que decorre entre o início da extracção e a acidificação do extracto após SPE é de cerca de 20 min, efectuaram-se ensaios a diferentes valores de pH, em intervalos de tempo definidos, com o objectivo de avaliar a estabilidade da molécula de patulina nessas condições.

5.2. Efeito da temperatura de conservação

É importante conhecer qual a temperatura/tempo de conservação que permite manter constante a concentração de patulina nas amostras, após abertura das embalagens. Com o objectivo de avaliar a estabilidade da patulina em diferentes temperaturas de conservação, efectuaram-se ensaios de quantificação em amostras fortificadas conservadas a -20 °C e a 4 °C ao longo de várias semanas.

5.3. Efeito do tempo (curva de calibração)

Alguns autores referem que os padrões da curva de calibração da patulina devem ser utilizados no dia da sua preparação (56) ou no prazo máximo de 1 semana (126). Com este estudo pretende-se avaliar a estabilidade dos padrões da curva de calibração, de forma a otimizar o período de armazenamento dos padrões e a possibilidade de os utilizar mais de uma vez.

5.4. Efeito das condições de evaporação

A definição das condições adequadas de evaporação em corrente de azoto, requer o estudo do efeito de alguns factores, nomeadamente, a temperatura, a pressão de azoto e o tempo de evaporação, sobre a estabilidade da patulina. Pretende-se determinar qual a combinação de valores de temperatura, pressão de azoto e tempo que permitem evaporar totalmente o solvente num curto espaço de tempo, sem que ocorram perdas significativas de patulina.

6. Validação de métodos analíticos

6.1. Nota introdutória

É fundamental desenvolver um método analítico adequado à análise de patulina em alimentos que cumpra os requisitos estabelecidos no Regulamento (CE) 1831/2003 (anexo 8) (9). Para isso o laboratório deve utilizar um método validado, estabelecer e implementar procedimentos de controlo interno da qualidade, participar em ensaios de aptidão e se possível acreditar o ensaio, segundo a norma internacional aplicável (geralmente a NP/EN/ISO 17025) (156). A validação de métodos é portanto uma etapa fundamental do sistema de medições, que o laboratório deve implementar para que sejam produzidos resultados credíveis (157).

A validação de métodos, tal como definida pela NP EN ISO/IEC 17025:2005 (156) é “ a confirmação através de exame e apresentação de evidência objectiva de que os requisitos específicos relativos a uma utilização pretendida são satisfeitos”. Consiste na utilização de um conjunto de ensaios analíticos que permitam estabelecer as características de desempenho do método de forma a verificar se as mesmas estão de acordo com as especificações aplicáveis, demonstrando portanto que o método é adequado ou está apto para a utilização pretendida.

A validação deve ser iniciada apenas após um período inicial de familiarização com o método a validar no qual os operadores adquirem conhecimentos sobre as condições de manuseamento e armazenamento das amostras, preparação de reagentes, realização dos ensaios, procedimentos de controlo da qualidade e interpretação dos resultados.

Os métodos de ensaio podem ser métodos normalizados ou métodos internos. Um método normalizado é um método de ensaio que segue o indicado numa norma de

ensaio ou documento normativo equivalente. Assume-se que estes métodos foram devidamente validados, estão sujeitos a actualização periódica, e são reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional ou internacional.

A selecção e implementação de um método com determinadas características ou aplicado a um determinado componente alimentar é mais fácil quando existe um método normalizado. Várias organizações científicas sem fins lucrativos têm compilado e publicado estes métodos para a análise de alimentos, os quais foram cuidadosamente desenvolvidos e validados. Estes métodos permitem comparar os resultados obtidos por diferentes laboratórios que seguiram o mesmo procedimento ou para avaliar os resultados obtidos por métodos novos e mais rápidos. Incluem-se neste grupo os métodos da AOAC, os quais são publicados na revista “The Journal of AOAC International” e no livro “AOAC International's Official Methods of Analysis”. Na área alimentar existem outras organizações com publicações do género, nomeadamente, AACC “American Association of Cereal Chemists”, AOCS “American Oil Chemists’ Society”, Standard Methods for the Examination of Dairy Products (American Public Health Association) e a Standard Methods for Examination of Water and Wastewater Analysis (American Public Health Association, American Water Work association and Water Environmental Association) (121).

Os métodos normalizados são geralmente validados através da realização de ensaios interlaboratoriais e posteriormente transcritos para norma. Um método interno é um método de ensaio que não segue uma norma de ensaio (nacional ou internacional) ou documento normativo equivalente e são geralmente validados internamente por um único laboratório (158).

A validação aplica-se a um determinado procedimento analítico para determinar um certo analito numa gama de concentrações especificada, presente num determinado tipo de material (matriz), utilizado com um objectivo especificado. De um modo geral, a validação deve permitir verificar que o método apresenta um desempenho adequado ao fim a que se destina em toda a gama de concentrações do analito e tipos de materiais aplicáveis (157, 158).

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações susceptíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo, nalgumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final. Os erros associados às medições analíticas podem ter diferentes origens, podendo ser apresentados do seguinte modo (157, 158):

- Erros aleatório de medição (afectam a repetibilidade).

- Efeito da corrida (considerado como resultante do “bias” de uma corrida e da variação aleatória de várias corridas).
- Efeito do laboratório (considerado como o “bias” de um único laboratório).
- “Bias” do método.
- Efeito de matriz.

A componente de erro associada à repetibilidade inclui contribuições de erros volumétricos, gravimétricos e de heterogeneidade do material de teste e são avaliados com base na dispersão dos resultados da análise de réplicas.

O efeito da corrida contribui com um efeito adicional de variação entre dias, associado, por exemplo, à mudança do operador, mudança de lotes de reagentes, recalibração do equipamento e alterações ambientais (por exemplo, mudança de temperatura).

As variações associadas ao laboratório resultam de factores relacionados, por exemplo, com variações de padrões, reagentes, equipamentos e de condições ambientais. As diferenças entre laboratórios são avaliadas através de estudos colaborativos entre laboratórios ou através da participação em ensaios interlaboratoriais (157, 158).

No caso da validação de um método interno cabe ao laboratório decidir qual o grau de exigência necessário, definindo quais os parâmetros de desempenho do método que devem ser caracterizados durante a validação, tendo em conta o fim a que se destina o método a validar (157). Os requisitos de validação podem estar especificados em directivas, normas ou guias, que sempre que possíveis devem ser seguidos. Por exemplo, a validação de métodos para análise alimentar deve seguir uma estratégia concordante com a utilizada pela *AOAC International*, *IUPAC* ou *EURACHEM*, as quais, garantem que a terminologia aplicada à validação, juntamente com o tratamento estatístico são interpretados de maneira consonante com o sector em questão (159).

6.2. Descrição do método

Quando se pretende validar um método interno de ensaio ter-se-á de efectuar a sua descrição e caracterização. A descrição dos métodos internos de ensaio deve ser feita em documentos, de forma detalhada e de modo a que qualquer pessoa com preparação adequada o possa executar. Estes documentos deverão conter os mesmos elementos que uma norma, nomeadamente, os elementos identificativos do documento, os elementos descritivos do método e os elementos bibliográficos e normativos (158).

6.3. Grau de exigibilidade

Sempre que um laboratório pratica métodos internos de ensaio terá que instruir um processo de validação desses métodos, que inclua todos os registos obtidos. A validação deve ser adaptada a cada caso, sendo progressivamente mais exigente nas seguintes situações (157, 158):

- Uma modificação menor da técnica relativamente a uma norma existente. Nestes casos as alterações não levantam dúvidas sobre a equivalência técnica dos resultados.
- Uma modificação maior da técnica relativamente à norma existente. Nestes casos as alterações originam dúvidas sobre a equivalência técnica dos resultados.
- Método baseado em técnica de ensaio conhecida, cuja aplicação ao ensaio pretendido venha descrita em literatura científica, não existindo norma de ensaio correspondente.
- Método baseado em técnica de ensaio conhecida, mas cuja aplicação ao ensaio pretendido não venha descrita em literatura científica.
- Método baseado em técnicas de ensaio inovadoras, não descritas na literatura científica.

Avaliado o grau de exigibilidade requerido para o método interno será necessário realizar alguns estudos de validação antes de o colocar em rotina, durante a sua implementação ou sempre que ocorra uma alteração relevante do mesmo.

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos seguintes parâmetros (158):

- Gama de trabalho/Linearidade.
- Limiares analíticos (Detecção e Quantificação).
- Sensibilidade.
- Precisão.
- Exactidão.

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por avaliação indirecta (linearidade/gama de trabalho, limiares analíticos, sensibilidade e precisão) e por avaliação directa (exactidão) e deverá pelo menos abranger as partes ou alterações cuja validação não tenha sido feita por organismo reconhecido (158, 160).

6.4. Avaliação indirecta

6.4.1. Especificidade/Selectividade

A especificidade de um método diz respeito ao grau ou à capacidade que esse método possui em distinguir a substância a analisar de outras substâncias, tais como impurezas, produtos de degradação, ou outros componentes da amostra (matriz). Esta característica depende, essencialmente, da técnica de medição descrita, podendo todavia variar de acordo com o tipo de composto ou de matriz (161).

Outras entidades como a IUPAC e a AOAC preferem o termo selectividade, reservando o termo especificidade para os procedimentos que são completamente selectivos. O termo especificidade apresenta várias abordagens ou implicações, de acordo com o tipo de ensaio (162):

- Testes de identificação: assegurar a identidade do analito.
- Testes de pureza: assegurar que todos os métodos analíticos utilizados permitem a determinação exacta do teor de impurezas do analito (e.g., teste das substâncias análogas, limite de metais pesados, limite de impurezas orgânicas voláteis).
- Doseamento: assegurar um resultado exacto, o qual avalia o teor do analito na amostra.

Na análise qualitativa (testes de identificação) deve ser demonstrada a capacidade do método para identificar o analito na presença de compostos de estrutura química semelhante que possam estar presentes. Esta capacidade pode ser demonstrada obtendo resultados positivos (nomeadamente por comparação com um material de referência conhecido) em amostras que contêm o analito, associadas a resultados negativos de amostras que não contêm o analito, e pela confirmação de que não se obtém uma resposta positiva com substâncias estruturalmente semelhantes ou análogas à do analito (162).

Nos métodos analíticos de doseamento de impurezas, a especificidade pode ser demonstrada fortificando o analito ou o produto com quantidades apropriadas de impurezas e demonstrando que estas impurezas são determinadas com precisão e exactidão aceitáveis.

Nos doseamentos, a demonstração da especificidade requer que seja demonstrado que o processo não é afectado pela presença de impurezas. Na prática, isto pode ser realizado através da fortificação da amostra com quantidades apropriadas de impurezas,

demonstrando que o resultado do doseamento não é afectado pela sua presença. Neste caso, os resultados são avaliados por comparação com a recuperação esperada se não houvesse interferência, ou seja, 100%.

A especificidade, no caso de métodos cromatográficos também pode ser demonstrada através dos valores da resolução de dois picos cromatográficos com tempos de retenção muito próximos (162).

6.4.2. Curvas de calibração

Em ensaios quantitativos a calibração é um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou quantidade conhecida de uma substância. Envolve a preparação de uma série de soluções padrão, de concentrações conhecidas, que são analisadas nas mesmas condições a aplicar à análise de amostras (158, 163).

Recomenda-se o uso da norma ISO 8466-1 (164) como referência para calibrações analíticas, designadamente para efectuar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados. Esta referência normativa define que o eixo vertical representa a resposta instrumental do equipamento e o eixo horizontal a concentração dos padrões utilizados, uma vez que se assume que os erros associados aos valores de x são desprezáveis relativamente aos valores de y . A equação da recta é definida como: $y = a + bx$, em que a representa a ordenada na origem e b o declive da recta.

Quando a curva de calibração representa uma função polinomial do primeiro grau, isto é, uma recta, e caso se utilize o método dos mínimos quadrados para as regressões lineares, pressupõe-se que os erros têm uma distribuição normal e que existe homogeneidade de variâncias ao longo da recta.

De acordo com a referida norma, são recomendados dez pontos de calibração, não devendo ser em número inferior a cinco, e a sua distribuição ao longo da gama de concentração deve ser equidistante. Quando não é efectuada a curva de calibração de todas as vezes que se analisa uma série de amostras, o laboratório deve definir um processo para verificação da validade da curva usada, face a critérios de aceitação de desvios. Devem existir critérios para aceitação das curvas de calibração relativos à linearidade e estabilidade entre calibrações, definidos internamente, nomeadamente evidenciar a estabilidade da curva através de um histórico de curvas de calibração.

6.4.2.1. Linearidade

A linearidade de um método é a capacidade de deduzir resultados de ensaios que são directamente, ou através de uma dedução matemática bem definida, proporcionais à concentração de analito nas amostras dentro de um dado intervalo de concentração. A forma mais simples de observar a linearidade é através da representação gráfica da resposta de uma medida vs a concentração ou quantidade da substância conhecida (curva de calibração) (158). Existem vários parâmetros para avaliar a linearidade incluindo os coeficientes de correlação e de determinação. No entanto, estes não devem ser utilizados de forma isolada para avaliar a linearidade uma vez que são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade. Outros testes de avaliação da linearidade incluem o teste das áreas normalizadas, o teste de análise de resíduos e o teste de RIKILT (165). Para efectuar estes testes aplicam-se as fórmulas descritas nos anexos 3, 4 e 5. A linearidade deve ainda ser avaliada de acordo com o modelo estatístico definido na norma ISO 8466-1 (164), tal como descrito no anexo 6. Este teste de linearidade designa-se por teste de Fisher-Snedecor ou teste de Mandel e baseia-se na comparação das variâncias obtidas a partir dos desvios padrão residuais da função de calibração linear e da função de calibração não linear. Os valores obtidos da curva de calibração são utilizados para calcular a função de calibração linear e a função de calibração não linear bem como os respectivos desvios padrão residuais. Partindo destes valores calcula-se o valor de VT (valor teste) que é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher para $n-1$ graus de liberdade e uma probabilidade de 95%:

- Se, $VT \leq F$, então a função de calibração é linear
- Se, $VT > F$, então a função de calibração não é linear

6.4.2.2. Gama de trabalho

A gama de trabalho pode ser definida como o intervalo entre a concentração inferior e superior do analito na amostra, para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um adequado nível de precisão e exactidão (158, 162, 164).

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias (anexo 7) (164). Se $VT \leq F(n-1, n-1; 0,99)$ a diferença entre as variâncias não é significativa, então a gama de trabalho está bem ajustada.

6.4.3. Limiares analíticos

Os limiares analíticos do método incluem o limite de detecção e o limite de quantificação.

6.4.3.1. Limite de detecção (LOD)

O limite de detecção define-se como “o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável”. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exacto (159).

O limite de detecção pode ser matematicamente definido por:

$$LOD = 3 \times S_{xo} \text{ (equação 1)}$$

Em que:

S_{xo} Desvio padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com a concentração mais baixa do intervalo de linearidade.

As várias determinações podem ser realizadas em condições de repetibilidade ou de precisão intermédia. Quando as análises são realizadas ao longo de vários dias de trabalho, elas são mais representativas das situações de rotina.

Quando o método analítico envolve a utilização da calibração linear, o limite de detecção é calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, de acordo com a expressão:

$$LOD = \frac{3 \times S_{y/x}}{b} \text{ (equação 2)}$$

Em que:

$S_{y/x}$ Desvio padrão residual da curva de calibração.

b Declive da curva de calibração.

6.4.3.2. Limite de quantificação (LOQ)

O LOQ é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exactidão e precisão aceitáveis (159). Pode ser calculado através da expressão:

$$LOQ = 10 \times S_{xo} \text{ (equação 3)}$$

Em que:

S_{xo} Desvio padrão correspondente a várias leituras (entre 10 e 20) do branco ou da solução com a concentração mais baixa do intervalo de linearidade.

Tal como já foi referido, as várias determinações podem ser realizadas em condições de repetibilidade ou de precisão intermédia. Quando as análises são realizadas ao longo de vários dias de trabalho, elas são mais representativas das situações de rotina.

Quando o método envolve a utilização de uma calibração linear, o limite de quantificação é calculado da seguinte forma:

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \text{ (equação 4)}$$

Em que:

$S_{y/x}$ Desvio padrão residual da curva de calibração.

b Declive da curva de calibração.

Independentemente da forma como é determinado, o limite de quantificação deverá ser confirmado ao longo das várias séries de trabalho. O laboratório deve definir o critério de aceitação para a variabilidade deste parâmetro (desvio padrão relativo)

6.4.4. Sensibilidade

A sensibilidade pode ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido ΔL e a variação da concentração ΔC correspondente a esse acréscimo (158).

$$\text{Sensib.} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \text{ (equação 5)}$$

Esta característica avalia a capacidade de um método (ou equipamento) para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito.

Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa recta de calibração.

6.4.5. Precisão

A precisão é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições (pré-estabelecidas) específicas. O valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de um desvio padrão do resultado do ensaio. Uma menor precisão é indicada através dum elevado desvio padrão (157-159, 161).

Os estudos de precisão permitem avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes efectuados sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, em condições previamente definidas. A precisão depende apenas da distribuição dos erros aleatórios - não fornece qualquer indicação sobre o grau de proximidade entre os resultados obtidos e o valor verdadeiro. A precisão pode ser medida em diferentes condições. A definição dessas condições determinará o tipo de estimativa da precisão que irá ser obtida.

6.4.5.1. Repetibilidade

A repetibilidade corresponde a uma estimativa da precisão obtida quando os resultados das medições são obtidos num único laboratório, por um único operador, utilizando o mesmo equipamento, durante um curto espaço de tempo. A repetibilidade dá uma indicação da variabilidade que ocorre num curto espaço de tempo e é geralmente usada para estimar as diferenças prováveis entre resultados de réplicas obtidas durante a análise de um mesmo lote ou série analítica (159, 161).

A precisão em condições de repetibilidade é normalmente expressa em termos de desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR).

De acordo com o Regulamento (CE) nº 401/2006 (119), repetibilidade (r) define-se como o “valor abaixo do qual se pode esperar que o valor absoluto da diferença entre os resultados de dois testes determinados, obtidos em condições de repetibilidade, nomeadamente a mesma amostra, o mesmo operador, os mesmos aparelhos, o mesmo laboratório e um intervalo curto, se situe dentro de limites específicos de probabilidade (normalmente 95%), sendo (119, 158):

$$r = 2,8 \times S_r \text{ (equação 6)}$$

onde

S_r Desvio padrão, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de repetibilidade.

O Coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) ou desvio padrão relativo da repetibilidade (DPR_r) para cada nível de concentração, expresso em percentagem é dado por (119, 158):

$$CV_r(DPR_r) = \frac{S_r}{\bar{X}} \times 100 \text{ (equação 7)}$$

Em que

\bar{X} Concentração média do analito obtida em condições de repetibilidade.

O uso de replicados permite a avaliação conjunta de fontes de incerteza relacionadas com a repetibilidade do método, nomeadamente:

- Volume de injeção.
- Integração dos sinais cromatográficos.
- Homogeneidade das amostras.
- Repetibilidade do detector.

Em rotina, a avaliação da precisão (repetibilidade) faz-se através da análise de duplicados. A percentagem (%) da diferença de duplicados (DD) é calculada através da seguinte equação:

$$DD(\%) = \frac{D}{\bar{X}} \times 100 \text{ (equação 8)}$$

D Diferença entre a concentração de analito obtida na análise de duas réplicas, $|X_1 - X_2|$.

\bar{X} Concentração média de analito (análise das duas réplicas, X_1 e X_2).

6.4.5.2. Precisão intermédia

Se a validação for efectuada por um único laboratório, o estudo da precisão com base em resultados de repetibilidade vai provavelmente subestimar as variações que ocorrem na realidade, durante a utilização do método em rotina. É por essa razão que os laboratórios que façam validação de métodos internos devem fazer também estudos de precisão intermédia (também designados por estudos de reprodutibilidade intralaboratorial) (119).

A precisão intermédia, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, o mesmo laboratório ou laboratórios diferentes mas fazendo variar uma ou mais condições, definindo exactamente quais as variações a introduzir. As condições a variar podem ser por exemplo o operador, o equipamento e o tempo, que será mais longo que o intervalo de tempo usado para efectuar ensaios de repetibilidade (158, 159).

Existem vários métodos de estudar este tipo de precisão. Será referida adiante a abordagem usada no planeamento do estudo da precisão intermédia do método de determinação de patulina em produtos à base de maçã.

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermédia existem vários métodos para a determinação e controlo desse parâmetro de qualidade, nomeadamente, através de cartas de controlo de amplitudes, que poderão ser aplicadas por exemplo para réplicas, para duplicados e para padrões estáveis ao longo do tempo (166).

O estudo da precisão intermédia do método permite a avaliação da contribuição combinada de diversos factores que contribuem para a precisão, nomeadamente:

- Variações dentro da mesma matriz.

- Condições de funcionamento do equipamento.
- Curva de calibração.
- Flutuações de temperatura e humidade.
- Lotes de reagentes.
- Mudanças de fase móvel.

6.4.5.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade reflecte a precisão de um método analítico efectuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre a mesma amostra, mas fazendo variar certas condições tais como o operador, o equipamento, o laboratório e/ou o tempo, efectuando os ensaios em intervalos de tempo mais ou menos longos. A reprodutibilidade de um método de análise é avaliada através participação em ensaios interlaboratoriais (157-159).

De acordo com o Regulamento (CE) nº 401/2006 (119) a reprodutibilidade (R_{prod}) define-se como o “valor abaixo do qual se pode esperar que o valor absoluto da diferença entre os resultados de dois testes determinados, obtidos em condições de reprodutibilidade, nomeadamente, com um material idêntico, realizado por operadores de laboratórios diferentes, utilizando o método de ensaio normalizado, se situe, dentro de um certo limite de probabilidade (normalmente 95%), de acordo com a seguinte equação:

$$R_{\text{prod}} = 2,8 \times S_R. \text{ (equação 9)}$$

onde

S_R Desvio padrão, calculado a partir dos resultados obtidos em condições de reprodutibilidade.

O Coeficiente de variação de reprodutibilidade (CV_R) ou desvio padrão relativo da reprodutibilidade.

$$CV_R (DPR_R) = \frac{S_R}{\bar{X}} \times 100 \text{ (equação 10)}$$

Em que

\bar{X} Concentração média do analito obtida em condições de reprodutibilidade.

6.5. Avaliação directa

Este tipo de avaliação visa essencialmente conhecer a exactidão dos métodos de ensaio. A exactidão pode ser definida como o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite. A exactidão é determinada através da veracidade e da precisão. A veracidade corresponde ao grau de concordância entre o valor médio de uma longa série de resultados de ensaios e um valor de referência aceite. A veracidade é geralmente expressa como o desvio sistemático ou enviesamento (“bias”) (161). A precisão já foi definida no ponto 6.4.5 desta secção. Para avaliar a exactidão de um método recorre-se geralmente a:

- Utilização de Materiais de Referência Certificados (MRC).
- Realização de ensaios interlaboratoriais.
- Realização de testes comparativos.

6.5.1. Materiais de referência certificados

Devem utilizar-se sempre que possível Materiais de Referência Certificados (MRC) na validação de um método de ensaio. Um MRC possui um valor de concentração (ou outra grandeza) para cada parâmetro e uma incerteza associada (158, 161).

O uso correcto dos MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. Compara-se o resultado obtido pelo laboratório com o valor inscrito no certificado do MRC, determinando o erro e a exactidão.

Quando o valor obtido não se situar dentro do intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas de tal desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las.

Para avaliar os resultados obtidos da análise de um MRC são utilizados os seguintes métodos:

- Erro relativo.
- Teste de hipóteses (teste t).
- Factor de desempenho z (“z-score”).

6.5.1.1. Erro Relativo

Uma forma de avaliar a exactidão de um método analítico é através do cálculo do erro relativo (Er), expresso em percentagem (%), aplicando a seguinte equação (158):

$$Er(\%) = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \times 100 \quad (\text{equação 11})$$

Em que

X_{lab} Valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética de valores obtidos).

X_v Valor aceite com verdadeiro, ou seja, o valor do certificado do MRC.

O erro relativo exprime a componente dos erros sistemáticos. Cabe ao laboratório definir qual o seu grau de exigência em termos de exactidão do método em estudo.

6.5.1.2. Teste de hipótese (teste t)

O laboratório poderá também averiguar a existência de erros sistemáticos associados ao método, através de um teste de hipótese (158):

$$t = \frac{(X_{lab} - X_v) \times \sqrt{n}}{Sx_{lab}} \quad (\text{equação 12})$$

Em que

X_{lab} Média dos valores experimentais obtidos pelo laboratório na análise do MRC.

X_v Valor aceite com verdadeiro, ou seja, o valor do certificado do MRC.

n Número de amostras analisadas.

Sx_{lab} Desvio padrão associado à média dos valores do laboratório (X_{lab}).

O valor t obtido (em módulo) é comparado com o valor crítico t_{tab} (tabelado para um dado grau de confiança e N-1 graus de liberdade) e toma-se como critério de aceitação.

Se $|t| \leq t_{tab}$ Não ficou estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos e portanto o ensaio é satisfatório.

Se $|t| > t_{tab}$ Ficou estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos e portanto o ensaio não é satisfatório.

6.5.1.3. Factor de desempenho z (“z-score”)

Outra forma de avaliar o desempenho do Laboratório na análise de um MRC é o cálculo do factor de desempenho ou z-score, usando a seguinte equação:

$$z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \text{ (equação 13)}$$

Em que

X_{lab} Média dos valores experimentais obtidos pelo laboratório na análise do MRC.

X_v Valor aceite com verdadeiro, ou seja, o valor do certificado do MRC.

S Unidade de desvio que pode ser a incerteza do MRC ou ainda outra unidade de desvio interna.

A avaliação poderá ser feita de acordo com a seguinte escala de pontuação (167):

$z < 2$	Satisfatório
$2 \leq z \leq 3$	Questionável
$z > 3$	Incorrecto

6.5.2. Ensaio interlaboratoriais

Existem diversos tipos de ensaios interlaboratoriais consoante os objectivos a que se destinam. Neste tipo de ensaios incluem-se (158):

- Ensaio interlaboratorial de aptidão: destina-se a avaliar o desempenho dos laboratórios participantes, funcionando nalguns países como uma condição para a acreditação do laboratório. Os participantes podem na maioria dos casos usar os métodos que entenderem.
- Ensaio interlaboratorial de normalização: destina-se a estudar as características de um método de análise, nomeadamente a sua repetibilidade e

reprodutibilidade. Neste caso é condição de acesso a utilização exclusiva do método em causa. Para validar um método e em particular para avaliar a exactidão será adequado recorrer a um ensaio interlaboratorial deste tipo.

A avaliação do desempenho do laboratório participante é feita pela entidade organizadora, através do cálculo do z-score (ver equação 13 e critérios de aceitação definidos na secção 6.5.1.3).

6.5.3. Testes comparativos

Os testes comparativos contribuem para a validação dos métodos internos de análise e consistem na comparação entre os resultados obtidos pelo método em estudo com os resultados obtidos utilizando um método de referência. O principal objectivo dos testes comparativos é o de avaliar a proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, é o de avaliar a exactidão do método interno em relação ao método de referência (158).

7. Cartas de controlo

O emprego das cartas de controlo (CC) é internacionalmente aceite como um dos meios mais eficientes de exercer e visualizar um controlo contínuo sobre os resultados produzidos, e detectar erros.

As CC foram introduzidas por Shewhart em 1931, e o conceito subjacente à sua utilização não mudou, ou seja, permitir o Controlo da Qualidade dos produtos (resultados) através de uma representação gráfica.

As cartas por medidas podem descrever o processo em termos de dispersão (variabilidade de amostra para amostra) e em termos de localização (média do processo).

Existem 3 tipos básicos de cartas de controlo, das quais se salientam as cartas de Shewart, de médias ou indivíduos, as cartas de amplitudes e as cartas de somas cumulativas, conforme apresentado na figura IV.2 (166).

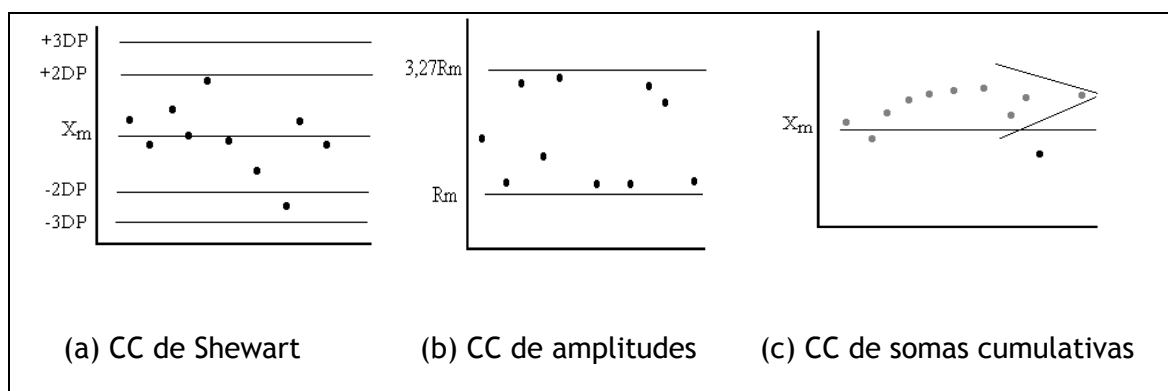


Figura IV.2: (a) Cartas de controlo de Shewart, de médias ou indivíduos, em que se representa a variação no tempo de um parâmetro seleccionado, (b) carta de controlo de amplitudes, em que se monitoriza a diferença ou amplitude de valores observada para ensaios repetidos e (c) carta de controlo de somas cumulativas (em inglês “Cusum”), em que se representa o somatório de desvios observados relativamente ao valor esperado.

Cada carta de controlo tem vantagens e inconvenientes, pelo que devemos escolher a mais adequada para o tipo de controlo que se pretende. Como no trabalho vão ser elaboradas as cartas controlo de Shewart, a secção seguinte apresenta de forma muito resumida, este tipo de cartas de controlo (166).

7.1. Cartas de controlo de Shewart, de médias ou indivíduos

As cartas de controlo partem do princípio que a ocorrência de erros é aleatória, pelo que, a distribuição de pontos em torno do valor médio (x_m) segue a Lei Normal (ou de Gauss). Assim, a probabilidade de um ponto se situar a mais de 2 desvios-padrão (2DP) do valor médio não ultrapassa os 5% e a mais de 3 desvios-padrão (3DP) não excede os 0,3%

Deste modo, além de uma linha central correspondente ao valor médio (x_m) costumam representar-se uma série de linhas de referência: as linhas $x_m \pm 2DP$, geralmente designadas como linhas de aviso e as linhas de $x_m \pm 3DP$, geralmente designadas como linhas de controlo.

Uma vantagem adicional da utilização de cartas de médias advém do teorema do Limite Central, pelo qual a distribuição de valores médios tende a seguir a Lei Normal, mesmo que a população individual não a siga.

Em alguns casos existe apenas um valor possível, por exemplo, uma leitura de um equipamento ou uma propriedade de um lote de um material, pelo que é necessário efectuar o controlo do processo sobre as leituras individuais.

Segundo as regras da Norma ISO 8258 (1991) (166), um processo encontra-se fora de controlo estatístico quando se verifica uma das situações seguintes:

- Regra 1: Um qualquer ponto fora dos limites de controlo (limites).
- Regra 2: Nove pontos consecutivos de um mesmo lado da linha central (\bar{X}_m).
- Regra 3: Seis pontos consecutivos em sentido ascendente ou descendente.
- Regra 4: Catorze pontos crescendo e decrescendo alternadamente.
- Regra 5: Dois de três pontos consecutivos na zona A (entre a linha de aviso e a de controlo), do mesmo lado da linha central.
- Regra 6: Quatro de cinco pontos consecutivos na zona B (entre $\pm 1DP$ e $\pm 2DP$) e ou A, do mesmo lado da linha central.
- Regra 7: Quinze pontos consecutivos na zona C ($\pm 1DP$).
- Regra 8: Oito pontos de ambos os lados da linha central, sem nenhum na zona C (entre a linha central e $\pm 1DP$).

Para elaborar uma carta de médias é necessário estabelecer por ensaios prévios (pelo menos 10), qual o valor médio e o respectivo desvio-padrão. Estes ensaios prévios devem ser realizados num espaço de tempo semelhante aquele em que depois se irão representar os dados (visto que geralmente o laboratório tem uma melhor repetibilidade do que precisão).

Após se ter obtido o valor médio e o desvio-padrão, traça-se a carta e começa-se a representar os pontos correspondentes às análises a controlar.

Em cada carta representam-se vários pontos de controlos (geralmente de 20 a 50), após o que se deve actualizar o valor médio e o desvio padrão utilizados.

Para fazer a actualização, o novo valor médio e desvio-padrão são calculados a partir de todos os pontos (excluindo os fora-de-controlo) obtidos e representados na última carta, ou apenas a partir dos pontos mais recentes. A nova carta irá ser construída com base nestes valores actualizados, e nela irão ser representados os novos pontos

de controlo, dando continuidade ao processo de controlo estatístico.

Caso existam variações significativas do valor médio e do desvio-padrão de uma carta para a(s) seguinte(s), convém encontrar as causas e avaliar a necessidade de aplicar medidas correctivas.

Capítulo V - Parte experimental

1. Equipamento e material

1.1. Equipamento

- Agitador cambalhota Heidolph, modelo Reax 2.
- Vortex, IKA modelo Genius 3.
- Aparelho de pH com eléctrodo combinado de vidro e sonda de temperatura, Metrohm, modelo 827 pH Lab.
- Balança Mettler Toledo, modelo AG 245.
- Balança Mettler Toledo, Modelo PB 3002/Fact.
- Banho ultrasons Grant, modelo MXB6.
- Bomba de vácuo Diaphragm vacuum pump, modelo MZ 2C.
- Centrifuga eppendorf, modelo 5804R.
- Cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC), Waters Alliance, modelo 2695, equipado com:
 - Detector de díodos, Waters, modelo 2998.
 - Bomba quaternária.
 - Desgaseificador.
 - Injector automático.
 - Amostrador automático com capacidade para 120 amostras e controlo de temperatura programável entre 4 e 40 °C.
 - Compartimento termostatizado para coluna, com temperaturas que variam entre 5 °C acima da temperatura ambiente e 65 °C.
 - “Loop” de 2000 µL.
 - Software Waters, Empower II versão 6.10.01.00.
- Concentradores a vácuo para SPE (24 posições), Macherey-Nagel.

- Evaporador de corrente azoto com banho de água Caliper, modelo Turbovap LV.
- Espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific, modelo Evolution 300LC.
- Sistema de obtenção de água ultra-pura Millipore, modelo Milli-Q Advantage.

1.2. Material

Nesta secção descreve-se o material específico utilizado no presente estudo. Não se apresenta o material de uso corrente de laboratório.

- Cartuchos para extracção em fase sólida, Sílica gel, Strata SI - 1,55 μm , 70 Å, 500 mg/3 mL, Phenomenex.
- Células de quartzo com percurso óptico de 1 cm.
- Coluna analítica de HPLC, 250 x 4,6 mm x 5 μm , Synergi Hydro-RP C18, Phenomenex.
- Filtros de seringa Acrodisc LC, 13 mm diâmetro, poro 0,45 μm , membrana em PVDF, PALL.
- Filtros de seringa Acrodisc LC, 13 mm diâmetro, poro 0,45 μm , membrana em PVDF, Millipore.
- Membranas para filtração de solventes para HPLC, filter type HV, 47 mm diâmetro, poro 0,45 μm , Millipore.
- Membranas para filtração de solventes para HPLC, filter type Fluoropore, 47 mm diâmetro, poro 0,45 μm , Millipore.
- Micropipetas de 200 μL e 1000 μL , Gilson.
- Pré-coluna 4 x 3 mm i.d. Hydro-RP C18, Phenomenex.
- Seringa de 100 μL , Exmire.
- Seringa de 500 μL , Hamilton.
- Seringa de 5000 μL , Hamilton.
- Sistema de filtração de solventes constituído por copo de vidro, funil, pinça metálica e kitasato, Millipore.
- Tubos de centrifuga, com rosca, PVC, 50 mL.
- Tubos de vidro 16 x 100 mm para evaporador de corrente azoto Turbovap.

- Vials de 2 mL com tampa de rosca e septo de teflon pré-perfurado, para amostrador automático de HPLC, Waters Alliance 2695.

2. Reagentes

2.1. Gerais

- Água ultra-pura (Millipore).
- Acetonitrilo, (CH_3CN), para HPLC, RS Plus, Carlo Erba Reagents.
- Acetato de etilo, ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), para LC, Merck.
- Ácido acético glacial 100%, (CH_3COOH), *p.a.*, Merck.
- Ácido perclórico 60%, (HClO_4), *p.a.*, Merck.
- Areia do mar purificada com ácido e calcinada, grão fino, (SiO_2), Merck.
- Etanol absoluto, ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), para LC, Merck.
- n-Hexano, (C_6H_{14}), Lichrosolv, Merck.
- Sulfato de sódio anidro, (Na_2SO_4), *p.a.*, Merck.
- Hidrogenocarbonato de sódio, (NaHCO_3), *p.a.*, Merck.

Nota: O acetonitrilo é filtrado através de membrana filtrante para soluções orgânicas (tipo fluoropore), de poro 0,45 μm , usando o sistema de filtração Millipore ligado a bomba de vácuo.

2.2. Padrões

- 5-Hidroximetilfurfural (HMF), ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$), > 99%, Sigma.
- Patulina (4-hidroxi-4H-furo (3,2-c)pirano-2(6H)-ona, $\geq 98\%$ (TLC), Sigma.

3. Soluções

Todas as soluções são preparadas e armazenadas em material de vidro. As soluções são armazenadas ao abrigo da luz e a uma temperatura entre 5 ± 3 °C.

3.1. Soluções gerais

Água a pH=4

Ajustar a água ultrapura a pH=4 com ácido acético (0,2%). Guardar em frasco de vidro, a 5 ± 3 °C.

Ácido acético em acetato de etilo

Adicionar 3 mL de ácido acético glacial 100% a 97 mL de acetato de etilo. Misturar e guardar em frasco de vidro rolhado.

Ácido acético 0,2%

Medir 0,5 mL de ácido acético glacial para balão de 250 mL. Completar com água ultrapura.

Solução de extracção acetato de etilo-n-hexano (60+40, v/v)

Misturar 180 mL de acetato etilo com 120 mL de n-hexano. Guardar em frasco de vidro rolhado.

Fase móvel para HPLC

Medir 940 mL de água ultrapura. Adicionar 60 mL de acetonitrilo e 1 mL de ácido perclórico a 60 %. Misturar. Filtrar através de membrana filtrante para soluções aquosas (tipo HV), de poro 0,45 µm, usando o sistema de filtração Millipore ligado a bomba de vácuo.

Solução de NaOH 0,01 M

Pesar rigorosamente cerca de 4 g de NaOH. Transferir para balão volumétrico de 100 mL, dissolver e completar com água ultrapura. Diluir 1 mL desta solução para 100 mL com água ultrapura.

3.2. Soluções de calibração

Solução mãe de calibração (± 200 mg/L)

Medir 5 mL de acetato de etilo com o auxílio de uma seringa Hamilton e transferir para o frasco fechado contendo patulina, perfurando o septo de borracha que constitui a tampa do referido frasco. Agitar. Transferir o conteúdo para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com acetato etilo. Armazenar esta solução em frascos de vidro com tampa de rosca a -20 °C. Esta solução é estável durante 6 meses. A concentração da solução é aferida em cada utilização de acordo com o procedimento descrito para a solução padrão de calibração.

Solução padrão de calibração (± 10 mg/L)

Evaporar 1 mL da solução mãe de patulina (± 200 mg/L) até à secura sob corrente de azoto. Dissolver o resíduo em cerca de 5 mL de etanol. Transferir para balão de 20 mL e completar com o mesmo solvente. Armazenar a -20 °C. Determinar a concentração da solução de patulina por espectrofotometria ($\lambda=276$ nm). Traçar o espectro de absorvência das soluções entre 350 e 250 nm numa célula de quartzo de 1 cm, usando etanol como branco. Aferir a concentração da solução de patulina (C) usando a equação 14 (147):

$$C = A_{\max} \times PM \times \frac{100}{\epsilon} \times \delta \text{ (equação 14)}$$

- C Concentração de patulina, mg/L.
- A_{\max} Absorvência da solução de patulina no comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvência ($\cong 276$ nm).
- PM Peso molecular da patulina (154,12 g/mol).
- ϵ Coeficiente de absorção molecular para a solução de patulina a 276 nm ($1460 \text{ m}^2/\text{mol}$ em etanol).
- δ Percurso óptico da célula, em cm.

3.3. Soluções padrão de fortificação

Solução mãe de fortificação (± 200 mg/L)

O padrão de patulina utilizado para preparar esta solução deve ser de um lote diferente do da calibração ou corresponder a uma nova pesagem. Preparar como referido para a solução mãe de calibração.

Solução padrão intermédia de fortificação (± 10 mg/L)

Evaporar 1 mL da solução mãe de fortificação (± 200 mg/L) até à secura sob corrente de azoto. Dissolver o resíduo em cerca de 5 mL de etanol. Transferir para balão de 20 mL e completar com o mesmo solvente. Armazenar a -20 °C. Aferir a solução de acordo com o procedimento descrito em 3.2. (aferição da solução padrão de calibração).

Solução padrão de fortificação (± 1 mg/L)

A partir da solução padrão intermédia de fortificação efectuar uma diluição 1:10 em água a pH=4.

3.4. Soluções padrão de controlo

As soluções mãe de controlo (± 200 mg/L), solução padrão intermédia de controlo (± 10 mg/L) e solução padrão de controlo (± 1 mg/L) são as mesmas das respectivas soluções de fortificação.

3.4.1. Controlos cromatográficos

Solução controlo 1 de patulina (± 8 µg/L)

Medir ± 40 µL de solução padrão intermédia de controlo (10 mg/L) para balão volumétrico de 50 mL e completar com água pH=4.

Solução controlo 2 de patulina ($\pm 25 \mu\text{g/L}$)

Medir $\pm 120 \mu\text{L}$ de solução padrão intermédia de controlo (10 mg/L) para balão volumétrico de 50 mL e completar com água $\text{pH}=4$.

3.4.2. Controlos de fortificação**Solução controlo de fortificação de patulina ($\pm 40 \mu\text{g/L}$)**

Medir $0,4 \text{ mL}$ de solução de fortificação a 1 mg/L para balão de 10 mL . Completar com água $\text{pH}=4$.

3.5. Soluções para o estudo da estabilidade

Foram efectuados estudos de estabilidade a partir da análise de soluções padrão de patulina e a partir da análise de amostras de sumo e purés fortificados com patulina.

3.5.1. Efeito do pH

Preparar soluções de patulina com diferentes valores de pH. Medir para 5 tubos, 5 mL de água a $\text{pH}=4$. Reservar um tubo para permanecer a $\text{pH}=4$. Ajustar o pH da água dos outros 4 tubos com $\text{NaOH } 0,01 \text{ M}$ de modo a obter valores de pH de 5, 6, 7 e 9.

Transferir $0,25 \text{ mL}$ de solução padrão de calibração de patulina ($\pm 10 \text{ mg/L}$) para 5 tubos do evaporador e evaporar o etanol em corrente suave de azoto. Dissolver o resíduo de cada um dos 5 tubos com $1,25 \text{ mL}$ de solvente a $\text{pH}=4$, $\text{pH}=5$, $\text{pH}=6$, $\text{pH}=7$ e $\text{pH}=9$, preparados anteriormente. A concentração final de cada uma destas soluções é de $\pm 2 \text{ mg/L}$ em patulina.

3.5.2. Efeito da temperatura de conservação (amostras)

Fortificar 500 mL de um sumo límpido 100% maçã com 1 mL de solução padrão intermédia de fortificação. A concentração final de patulina é de $25 \mu\text{g/kg}$.

3.5.3. Efeito do tempo (curva de calibração)

Preparar padrões de patulina correspondentes a 5 níveis de concentração (8, 16, 25, 50 e 100 µg/L) por diluição da solução padrão de calibração (± 10 mg/L) com água a pH=4.

3.5.4. Efeito das condições de evaporação (temperatura, pressão e tempo)

Solução padrão de patulina a ± 50 µg/L

Medir $\pm 0,25$ mL de solução padrão de calibração (± 10 mg/L) para balão de 50 mL, usando como solvente a solução de extracção acetato de etilo e n-hexano (60+40, v/v). Medir 5,5 mL desta solução para um tubo de evaporador e adicionar 50 µL de solução de ácido acético em acetato etilo.

Amostra fortificada a ± 28 µg/kg

Fortificar 10 g de um sumo límpido 100% maçã com 0,2 mL de solução padrão de fortificação (1,35 mg/L).

3.6. Soluções para a optimização e validação do método

3.6.1. Soluções para o estudo da selectividade

Solução mãe de 5-hidroximetilfurfural (HMF) (± 200 mg/L)

Pesar rigorosamente cerca de 5 mg de HMF. Transferir para balão volumétrico de 25 mL, dissolver e completar com acetato de etilo. Guardar a -20 °C.

Solução intermédia de HMF (± 10 mg/L)

Evaporar em corrente de azoto 1 mL da solução mãe de HMF (± 200 mg/L) até à secura. Dissolver o resíduo em cerca de 5 mL de etanol. Transferir para balão de 20 mL e completar com o mesmo solvente. Armazenar a -20 °C.

Solução padrão de HMF ($\pm 50 \mu\text{g/L}$)

Medir 0,25 mL de solução intermédia de HMF para balão volumétrico de 50 mL e completar com água a pH=4.

Solução padrão conjunta de patulina e HMF ($\pm 50 \mu\text{g/L}$)

Medir 0,5 mL de solução padrão de calibração de patulina ($\pm 10 \text{ mg/L}$) e 0,5 mL de solução intermédia de HMF ($\pm 10 \text{ mg/L}$) para um tubo de evaporação. Evaporar em corrente suave de azoto. Dissolver em 2,5 mL de água pH=4. Medir 0,25 mL para balão volumétrico de 10 mL e completar com água a pH=4.

3.6.2. Soluções padrão para o estudo da linearidade (SPLIN)

Preparar 19 padrões de calibração de concentrações entre 2 e 100 $\mu\text{g/L}$ por diluição da solução padrão de calibração ($\pm 10 \text{ mg/L}$) com água a pH=4. Os volumes medidos são ajustados de acordo com a concentração aferida da solução padrão de calibração ($\pm 10 \text{ mg/L}$).

3.6.3. Soluções padrão para o estudo da homogeneidade de variância

Preparar 10 soluções independentes de solução padrão de calibração de concentração 8 e 100 $\mu\text{g/L}$. Estas soluções são preparadas de acordo com o descrito na secção 3.6.2. (Soluções padrão para o estudo da linearidade).

3.6.4. Soluções para o estudo dos limiares analíticos**3.6.4.1. Método cromatográfico (HPLC-UV)****Solução padrão de patulina ($\pm 8 \mu\text{g/L}$)**

Preparar 10 soluções independentes de $\pm 8 \mu\text{g/L}$ por diluição de $\pm 40 \mu\text{L}$ de solução padrão de calibração (10 mg/L) para balão volumétrico de 50 mL e completar com água pH=4.

3.6.4.2. Método global (SPE-HPLC-UV)

Amostra fortificada a $\pm 5 \mu\text{g/kg}$

Fortificar 10 amostras de cada matriz com patulina. Fortificar 10 g de sumo límpido, sumo turvo ou puré à base de maçã com 40 μL de solução padrão de fortificação (1 mg/L).

3.6.5. Soluções para o estudo da precisão

3.6.5.1. Repetibilidade

3.6.5.1.1. Método cromatográfico (HPLC-UV)

Preparar 10 soluções independentes de cada uma das seguintes soluções:

Solução padrão de patulina ($\pm 8 \mu\text{g/L}$)

Medir $\pm 40 \mu\text{L}$ de solução padrão intermédia de controlo (10 mg/L) para balão volumétrico de 50 mL e completar com água pH=4

Solução padrão de patulina ($\pm 25 \mu\text{g/L}$)

Medir $\pm 120 \mu\text{L}$ de solução padrão intermédia de controlo (10 mg/L) para balão volumétrico de 50 mL e completar com água pH=4.

Solução padrão de patulina ($\pm 100 \mu\text{g/L}$)

Medir $\pm 250 \mu\text{L}$ de solução padrão intermédia de controlo (10 mg/L) para balão volumétrico de 25 mL e completar com água pH=4.

3.6.5.1.2. Método global (SPE-HPLC-UV)

Preparar 6 réplicas independentes de amostras fortificadas (sumo límpido, sumo turvo e puré) com $\pm 5 \mu\text{g/kg}$, $\pm 28 \mu\text{g/kg}$ e $40 \mu\text{g/kg}$ de patulina.

Amostra fortificada, $\pm 5 \mu\text{g/kg}$

Fortificar 10 g de sumo límpido, sumo turvo ou puré à base de maçã com 40 μL de solução padrão de fortificação (1,35 mg/L).

Amostra fortificada, $\pm 28 \mu\text{g/kg}$

Fortificar 10 g de sumo límpido, sumo turvo ou puré à base de maçã com 200 μL de solução padrão de fortificação (1,35 mg/L).

Amostra fortificada, $\pm 40 \mu\text{g/kg}$

Fortificar 10 g de sumo límpido, sumo turvo ou puré à base de maçã com 300 μL de solução padrão de fortificação (1,35 mg/L).

3.6.5.2. Precisão intermédia**3.6.5.2.1. Método cromatográfico (HPLC-UV)**

Preparar várias soluções de acordo com o procedimento descrito para o estudo da repetibilidade cromatográfica (secção 3.6.5.1.1)

3.6.5.2.2. Método global (SPE-HPLC-UV)

Preparar no mínimo 18 réplicas independentes de amostras fortificadas (sumo límpido, sumo turvo e puré) com $\pm 5 \mu\text{g/kg}$ e $\pm 28 \mu\text{g/kg}$ de patulina, de acordo com o procedimento descrito para o estudo da repetibilidade do método global (secção 3.6.5.1.1.).

3.7. Materiais de referência para o estudo da exactidão

Os estudos de exactidão foram efectuados com os materiais de referência previamente analisados durante os ensaios interlaboratoriais. Os materiais de referência analisados foram os seguintes:

- FAPAS T 1626, sumo límpido de maçã.
- FAPAS T 1631, sumo turvo de maçã.
- FAPAS T 1622 puré de maçã.

3.8. Materiais de referência utilizados no controlo de qualidade interno

No âmbito do controlo de qualidade interno (CQI) foram analisados materiais de referência previamente analisados durante ensaios interlaboratoriais. Os materiais de referência analisados foram os seguintes:

- FAPAS T 1622, puré de maçã.
- FAPAS 1626, sumo maçã, límpido.
- FAPAS 1621 sumo maçã para crianças, límpido.
- Bipea 28-008-0328-0026, puré de maçã.

4. Descrição da metodologia analítica

A figura V.1 resume a sequência de ensaios utilizada no decurso do trabalho experimental.

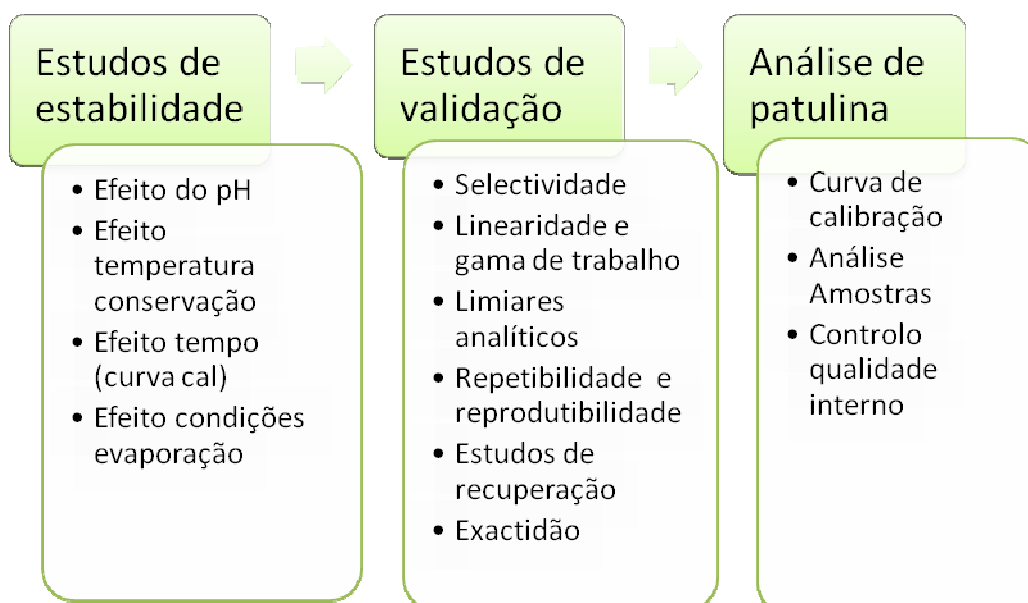


Figura V.1: Sequência do trabalho experimental para a optimização, validação e análise da patulina por SPE-HPLC-UV em sumos (límpido e turvo) e purés à base de maçã.

4.1. Estudos de estabilidade da patulina

4.1.1. Efeito do pH

Analisar soluções padrão de patulina a 2 mg/L com valores de pH compreendidos entre 4,0 e 9,0 (secção 3.5.1.).

Efectuar leituras de absorvência das várias soluções, no espectrofotómetro ($\lambda=276$ nm), no dia da sua preparação, 30 minutos após o acerto do pH.

Conservar estas soluções a 5 ± 3 °C durante 3 semanas e no final deste período de tempo efectuar novas leituras de absorvência.

Verificar se existe diminuição da concentração de patulina em função do pH e/ou em função do tempo de armazenamento.

4.1.2. Efeito da temperatura de conservação

Dividir a amostra de sumo límpido de maçã fortificada com patulina (± 28 µg/kg) em alíquotas de 10 g e repartir em dois grupos.

Conservar um grupo a -20 °C e o outro a 5 ± 3 °C durante 9 semanas. Analisar 2 amostras de cada temperatura por semana.

Comparar a concentração de patulina nas amostras conservadas a -20 °C e a 5 ± 3 °C ao longo do tempo, com a concentração inicial de patulina.

Determinar o erro relativo (%) para cada temperatura, ao longo das semanas de armazenamento, utilizando a fórmula apresentada no ponto 6.5.1.1 do capítulo IV (Metodologia analítica).

4.1.3. Efeito do tempo (curva de calibração)

Preparar os cinco padrões da curva de calibração (8, 16, 25, 50 e 100 µg/L) e analisar por HPLC-UV. Guardar estes padrões durante 8 semanas a 5 ± 3 °C. Analisar semanalmente.

Registar as áreas dos picos cromatográficos dos vários padrões ao longo das várias semanas.

Avaliar as nove curvas de calibração em termos de declive, ordenada na origem e coeficiente de determinação.

Calcular a concentração em patulina de dois controlos (8 e 25 µg/L) analisados em três séries de trabalho independentes (áreas dos respectivos picos cromatográficos) através das equações das várias rectas (9 equações da recta). Determinar a concentração média de cada controlo (3 réplicas).

Determinar a diferença de duplicados (DD%) para cada nível de concentração dos controlos e utilizar como valor de referência a concentração de patulina obtida na primeira semana de trabalho (tempo 0).

4.1.4. Efeito das condições de evaporação

Para avaliar a influência dos principais factores de perda da patulina durante o processo de evaporação preparou-se uma solução de patulina em n-hexano/acetato de etilo e evaporou-se em diferentes condições de temperatura, pressão e tempo. O resíduo foi dissolvido em água pH=4 e esta solução foi analisada por HPLC-UV. Numa primeira fase estudou-se o efeito da temperatura e pressão de azoto e numa fase posterior estudou-se o efeito do tempo de evaporação.

4.1.4.1. Efeito da temperatura e pressão

Para o estudo da influência da pressão de azoto e temperatura de evaporação foram ensaiados os valores de pressão de 5,10,15 e 20 psi e os valores de temperatura de 35, 40 e 45 °C. Efectuaram-se ensaios em doze condições diferentes, correspondentes a todas as combinações possíveis dos valores de pressão e temperatura em estudo, utilizando um tempo de evaporação variável, correspondendo apenas ao necessário para a completa evaporação do solvente.

Evaporar 5,5 mL de solução padrão de patulina a 50 µg/L e registar o tempo gasto nesse processo. Para cada condição de pressão e temperatura foram efectuados 5 ensaios. Após evaporação, dissolver o resíduo em 5,5 mL de água pH=4. Transferir para “vial” e analisar por HPLC-UV de acordo com as condições analíticas descritas nas tabelas V.1,V.2 e V.3.

Para valores de recuperação elevados e semelhantes considerou-se também o tempo de evaporação, seleccionando as condições correspondentes ao menor tempo de evaporação.

Determinar qual a relação de temperatura e pressão que permite obter os melhores valores de recuperação da patulina.

4.1.4.2. Efeito do tempo de evaporação

Para o estudo da influência do tempo de evaporação seleccionaram-se vários tempos de evaporação, escolhendo como valor mais baixo um tempo insuficiente para a evaporação total do solvente e como valor mais alto um tempo de evaporação considerado excessivo. Estes ensaios foram efectuados nas condições de temperatura e pressão de azoto optimizadas na secção anterior.

Evaporar a solução de patulina a 50 µg/L a 4 tempos de evaporação (10, 20, 30 e 40 minutos) à temperatura 40 °C e pressão de 15 psi (condições de pressão e temperatura optimizadas na secção anterior). Para cada tempo de evaporação efectuar 5 ensaios. Após evaporação dissolver o resíduo em 5,5 mL de água pH=4. Transferir para “vial” e analisar por HPLC-UV de acordo com as condições analíticas descritas nas tabelas V.1, V.2 e V.3.

Seleccionar o tempo de evaporação que permitir a evaporação total do solvente mas que simultaneamente permita obter o valor de recuperação mais elevado.

4.1.4.3. Análise de uma amostra nas condições optimizadas de evaporação

Analisar 4 amostras de sumo límpido fortificadas com 28 µg/kg de acordo com as condições analíticas descritas nas tabelas V.1, V.2 e V.3., utilizando valores de temperatura, pressão e tempo de 40 °C, 15 psi e 20 minutos, respectivamente. Calcular a recuperação média e respectivo desvio padrão relativo.

4.2. Análise cromatográfica

4.2.1. Fundamento do método

A análise de patulina em amostras de sumo e purés à base de maçã baseia-se numa extracção da patulina do género alimentício com solvente orgânico, seguida de purificação do extracto por extracção em fase sólida (SPE) e análise do extracto purificado por HPLC-UV.

A figura V.2 apresenta de forma resumida o procedimento analítico de determinação de patulina por SPE-HPLC-UV.

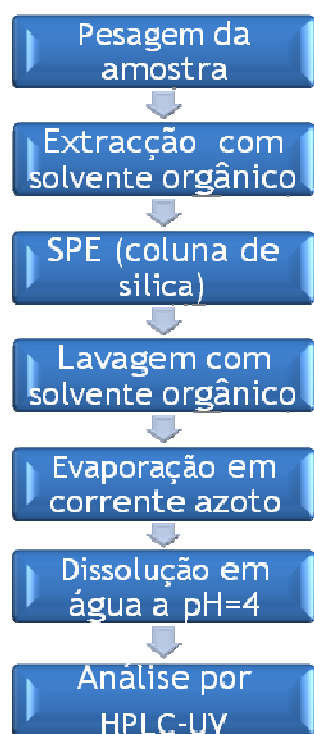


Figura V.2: Análise da patulina por SPE-HPLC-UV em sumos (límpido e turvo) e purés à base de maçã.

A extracção de patulina das amostras é feita com uma mistura de solventes orgânicos (n-hexano e acetato de etilo) na presença de areia, sulfato de sódio anidro e hidrogenocarbonato de sódio.

A areia tem como função dividir finamente a amostra, evitando a formação de aglomerados que possam dificultar a extracção da patulina.

O sulfato de sódio anidro desidrata a fase orgânica, evitando que o extracto orgânico contendo a patulina fique hidratado, o que poderia afectar a estabilidade da molécula em particular durante a evaporação do solvente (126).

O hidrogenocarbonato de sódio permite reter alguns compostos fenólicos na fase aquosa (152), evitando a sua passagem para o extracto orgânico, diminuindo o número de interferentes no extracto (análise cromatográfica). Os compostos fenólicos possuem uma estrutura química semelhante à da patulina, e deste modo, podem absorver no mesmo comprimento de onda e apresentar tempos de retenção semelhantes.

Esta primeira parte do procedimento deve ser efectuada o mais rapidamente possível para evitar perdas de composto inerentes à estabilidade da patulina (56, 168).

Centrifugar o extracto orgânico e aplicar o extracto no cartucho de sílica não condicionado (SPE). Este tipo de coluna retém compostos interferentes e deixa eluir a

patulina. O extracto purificado é recolhido num tubo contendo ácido acético cuja principal função é evitar a degradação da patulina.

Seguidamente lavar o cartucho com o solvente de extracção seguindo-se a evaporação do extracto até à secura, em corrente de azoto, em condições previamente optimizadas. A evaporação prolongada pode conduzir a perdas significativas de patulina.

Após a evaporação, redissolver imediatamente o resíduo em água a pH=4, filtrar e transferir para “vials” de HPLC.

Efectuar a análise por HPLC de fase reversa, utilizando uma coluna do tipo C₁₈, com detecção por ultravioleta, fixando o comprimento de onda em 276 nm. Paralelamente traçar o espectro da patulina entre 200 e 340 nm para estudos de pureza de pico.

4.2.2. Técnica

4.2.2.1. Pesagem

Pesar rigorosamente cerca de 10 g de amostra para tubo de centrífuga de 50 mL. Em caso de amostras líquidas em que o resultado final deve ser dado em µg/L, a toma de ensaio deve ser de 10 mL em vez de 10 g. No caso de amostras líquidas, anotar também o peso.

No caso dos estudos de recuperação, pesar rigorosamente 10 g de amostra (puré ou sumo) em tubo de centrífuga de 50 mL. Adicionar 200 µL da solução padrão de fortificação 1 µg/mL tendo o cuidado de depositar a solução sobre a amostra, evitando tocar nas paredes do tubo. Agitar a mistura amostra+padrão no vortex durante 3 minutos para completa homogeneização.

4.2.2.2. Extracção

Adicionar a um tubo de centrífuga limpo, 2g areia, 15 g de Na₂SO₄ e 2g de NaHCO₃. Agitar, adicionar 10 ml de solvente de extracção, acetato de etilo + n-hexano (60+40, v/v) e fechar bem. O tubo de centrífuga está agora pronto para análise.

Transferir o conteúdo do tubo preparado anteriormente para o tubo de centrífuga que contém a amostra, com auxílio de um funil de bucal largo. Agitar vigorosamente com a mão durante alguns segundos e depois exactamente durante 5 minutos num agitador mecânico.

Centrifugar a mistura a baixa velocidade (1850 rpm ou 300-400 g) durante 1 minuto para promover a separação das 2 camadas.

4.2.2.3. Purificação do extracto por SPE

Adicionar 50 µL de ácido acético em acetato de etilo a um tubo de vidro com tampa de rosca de 10 mL e colocá-lo debaixo de um cartucho de SPE de sílica gel (não acondicionado).

Após extracção transferir imeditamente 2,5 mL de extracto centrifugado para o cartucho e deixar eluir para o tubo de vidro de 10mL, gota a gota (*i.e.* pela força da gravidade).

Eluir a patulina do cartucho de SPE com 3mL da mistura de acetato de etilo + n-hexano (60+40 v/v). Após passagem da maior parte da solução de lavagem, forçar a saída do restante solvente para o tubo, ligando a bomba de vácuo durante alguns segundos.

Evaporar o eluído no Turbovap a 40 °C, 15 psi, durante aproximadamente 20 minutos.

Dissolver o resíduo com 1 mL de água pH=4. Agitar o tubo no vortex durante 3 minutos para assegurar que a patulina está totalmente redissolvida. Filtrar com filtros de seringa de PDVF (13 mm diâmetro, poro 0,45 µm) para o “vial”. Analisar o extracto por HPLC-UV de acordo com as condições descritas em 4.2.3..

4.2.3. Condições cromatográficas

Na tabela V.1 apresentam-se as condições analíticas utilizadas para a análise de patulina.

Trabalhar em modo isocrático utilizando uma fase móvel maioritariamente aquosa (94% de água e 6% de acetonitrilo). A composição da fase móvel, em particular a percentagem de acetonitrilo foi ajustada para reduzir o tempo de retenção da patulina, mantendo uma boa resolução cromatográfica entre a patulina e o HMF. Com este objectivo, foi injectada uma solução padrão conjunta de patulina e HMF com uma concentração de $\pm 50 \mu\text{g/L}$.

Tabela V.1: Condições cromatográficas para a análise de patulina por HPLC-UV

Parâmetro	Condições cromatográficas
Pré-coluna	C18, Phenomenex
Coluna cromatográfica	Fase reversa, Synergi RP C18, Phenomenex
Composição da fase móvel	Água:Acetonitrilo:Ácido perclórico (94:6:0,1)
Modo	Isocrático
Fluxo do eluente	1 mL/min
Temperatura da coluna	25 °C
Temperatura do amostrador	10 °C
Detector de díodos (UV)	Comprimento onda fixo a 276 nm
Volume de injeção	200 µL

Como durante a purificação da amostra nem todos os constituintes da matriz são removidos, o cromatograma é constituído por mais que um pico. Estas substâncias são principalmente o 5-hidroximetilfurfural (HMF), polifenóis e vestígios de ácidos fenólicos. Infelizmente estas substâncias apresentam propriedades cromatográficas e ópticas semelhantes às da patulina e por essa razão possuem tempos de retenção idênticos e também dão origem a uma resposta ou sinal no detector.

Alguns dos interferentes possuem tempos de retenção longos (muito superiores ao tempo de retenção da patulina) sendo por isso designados por “late eluting peaks”. Estes picos interferem com a análise e devem ser removidos por lavagem do sistema.

Uma das formas de remover estes interferentes é correr um gradiente com elevado teor de solvente orgânico. Este gradiente inclui um passo de lavagem com 60 a 90% de acetonitrilo durante aproximadamente 1-2 volumes da coluna, que corresponde a 3-6 minutos (168).

Após este passo de lavagem é muito importante que a coluna equilibre com a fase móvel utilizada na determinação de patulina. Como a fase móvel contém uma baixa percentagem de acetonitrilo é necessário passar pelo menos 5 volumes da coluna. No

caso de uma coluna de 25 cm x 4,6 mm isto corresponde a passar entre 15 a 30 mL de fase móvel (168).

Deste modo, estabelecer um programa de lavagem da coluna entre injeções de amostra para eliminar compostos interferentes presentes na matriz que não tenham eluído durante o tempo de corrida. Após o programa de lavagem proceder a um tempo de estabilização da coluna, o qual, corresponde à passagem de fase móvel A (100%) durante 18 minutos.

Para testar este programa foram injectadas amostras fortificadas ($\pm 28 \mu\text{g/kg}$) de sumo límpido, sumo turvo e puré. Na tabela V.2 apresenta-se o programa de lavagem da coluna entre injeções de amostras.

Injectar 200 μL de 5 soluções padrão de calibração. Traçar a curva de calibração área *versus* concentração da patulina ($\mu\text{g/L}$).

Tabela V.2: Programa de lavagem e de equilíbrio da coluna entre injeções de amostra.

Tempo (min)	A (Fase móvel)	B (Acetonitrilo)	D (Água)
	100	0	0
3	0	100	0
4	0	100	0
9	0	65	35
10	0	65	35
11	100	0	0
30	100	0	0

4.3. Condições de purificação da amostra

Nas tabelas V.3 e V.4 estão definidas as condições de SPE e de evaporação usadas no passo de purificação dos extractos contendo patulina.

Tabela V.3: Purificação das amostras por SPE

Condições do procedimento de SPE	
Coluna SPE	Sílica gel, 500 mg/3 mL
Volume de amostra (sumo ou puré)	2,5 mL
Volume de solução de lavagem (acetato etilo/n-hexano)	3 mL
Fluxo de passagem de amostra e de solução de lavagem	± 1 gota/min

Tabela V.4: Condições de evaporação no Turbovap LV

Condições do Turbovap LV	
Temperatura	40 °C
Pressão	15 psi
Tempo	18 min.

5. Validação do método

O procedimento de validação da patulina foi elaborado com base em guias Eurachem (159, 163, 167), guia Relacre 13 (158), legislação (119, 161), normas (156, 164, 169-173) nacionais e internacionais utilizadas neste tipo de procedimentos e no artigo “Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis” da IUPAC (157).

O método analítico a validar tem como principal objectivo a determinação dos teores de patulina em sumos e purés à base de maçã destinados a lactentes e crianças jovens. Seleccionou-se um método de HPLC-UV, publicado por Arranz *et al* em 2005 (147), o qual permite quantificar níveis de patulina de 10 µg/kg, valor que corresponde ao limite estabelecido no Regulamento CE/1881/2006 (9).

Apesar de este método ter sido alvo de um estudo colaborativo, não é um método normalizado, e deste modo, é mais exigente na avaliação dos vários parâmetros de desempenho no âmbito da validação.

O trabalho seguiu uma estratégia de validação, estruturada em várias etapas, nomeadamente:

- a) Desenvolvimento de um procedimento de validação.
- b) Definição dos objectivos do ensaio e respectivo campo de aplicação.
- c) Identificação dos parâmetros de desempenho e dos critérios de aceitação, ou seja, definir quais são os parâmetros de desempenho que é necessário estudar e que valores devem ter.
- d) Planear os ensaios a efectuar para validar o método.
- e) Verificar se as características de desempenho dos equipamentos são compatíveis com o método em avaliação.
- f) Definir e qualificar os materiais, reagentes, padrões, etc, a serem utilizados.
- g) Executar ensaios prévios de validação.
- h) Realizar os estudos de validação.
- i) Interpretar os resultados obtidos durante o processo de validação. A informação sobre o desempenho do método, obtida durante os ensaios de validação é comparada com os critérios de desempenho estabelecidos no ponto b). É necessário avaliar se o método apresenta um desempenho aceitável comparando os resultados obtidos durante a validação com os critérios previamente estabelecidos. A validação só termina se essa comparação demonstra que o desempenho do método é satisfatório e nesse caso considera-se que o método é adequado ao fim a que se destina. Caso contrário serão necessários estudos suplementares de desenvolvimento ou optimização do método.
- j) Escrever procedimentos de ensaio a utilizar em rotina.
- k) Definir o controlo de qualidade (tipo e frequência).
- l) Definir os critérios de reavaliação (mudança de pessoal, condições ambientais, equipamentos, periodicidades, etc.).
- m) Efectuar o relatório de validação.

Para a validação do método de SPE-HPLC-UV foram realizados vários ensaios com o objectivo de avaliar a selectividade, o intervalo de linearidade e a gama de trabalho, os limiares analíticos, a precisão e a exactidão do método.

5.1. Selectividade/especificidade

O 5-hidroximetilfurfural (HMF) é referido por muitos autores como o principal interferente na análise da patulina. Para avaliar se as condições analíticas permitem uma boa separação entre o pico do HMF e o pico da patulina injectar soluções padrão dos compostos individuais e de uma solução contendo os dois compostos.

5.2. Linearidade e gama de trabalho

5.2.1. Linearidade

Para a determinação do intervalo de linearidade, foram analisadas 19 soluções numa gama de concentrações de 2 a 100 µg/L (SPLIN).

Depois de efectuada a regressão linear e com o objectivo de definir o intervalo de linearidade efectuaram-se vários testes estatísticas incluindo análise de resíduos, teste das áreas normalizadas, teste de RIKILT e teste de Mandel (teste de Fisher-Snedecor). Na tabela V.5 apresentam-se os critérios de aceitação para a avaliação do intervalo de linearidade.

Tabela V.5: Critérios de aceitação para a definição do intervalo de linearidade e da gama de trabalho.

Parâmetro	Critério de aceitação
Coeficiente de determinação (R^2):	$\geq 0,995$
Coeficiente de variação do método (CV_m)	$\leq 10\%$
Análise de resíduos	$\leq 10\%$
Teste das áreas normalizadas	$\leq 10\%$
Teste de RIKILT	$\leq 10\%$
Teste de Mandel	$VT \leq F(1, N-3)95\%$

A aplicação destes testes é um processo sequencial. A não obediência a um critério de aceitação, implica o encurtamento da curva de calibração e a reformulação de todos os testes.

5.2.2. Gama de trabalho

Depois de definido o intervalo de linearidade, analisar 10 réplicas da solução padrão da concentração mais baixa da gama de concentração (8 µg/L) e 10 réplicas da solução padrão de concentração mais alta da gama de concentração (100 µg/L). Determinar o desvio padrão (S) e a variância (S^2) das dez leituras referentes a cada nível de concentração.

A gama de trabalho foi avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias de acordo com a norma ISO 8466-1 (anexo 7). A gama de trabalho está bem ajustada se $VT \leq F(N-1, N-1)$, 99%.

5.3. Limiares analíticos (LOD e LOQ)

5.3.1. Método cromatográfico (HPLC-UV)

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método de HPLC-UV foram determinados por dois métodos diferentes. Um deles baseia-se no desvio padrão residual da curva de calibração ($S_{x/y}$) e no declive (b), aplicando as fórmulas definidas pelas equações 2 e 4 apresentadas na secção 6.4.3 do capítulo IV (Metodologia analítica). O outro baseia-se nos ensaios de repetibilidade, isto é, na determinação do desvio padrão das leituras de 10 soluções padrão independentes, cuja concentração corresponde ao primeiro nível de concentração do intervalo de linearidade (8 µg/L), aplicando as fórmulas definidas pelas equações 1 e 3 apresentadas na secção 6.4.3 do capítulo IV.

Os limiares analíticos expressos em µg/L são convertidos em µg/kg através da equação 16 apresentada na secção 6.5 deste capítulo.

5.3.2. Método global (SPE-HPLC-UV)

O LOD e o LOQ do método global (SPE-HPLC-UV) foram determinados com base em ensaios de repetibilidade utilizando amostras fortificadas.

Efectuar 10 ensaios independentes de amostras de sumo límpido, de sumo turvo e de puré de maçã fortificadas com 5 µg/kg de patulina.

Determinar o desvio padrão (S_{xo}) dos valores de concentração obtidos para cada amostra fortificada e calcular o LOD e o LOQ utilizando as fórmulas referidas pelas equações 1 e 3 da secção 6.4.3 do capítulo IV. Verificar se existem diferenças significativas entre os limiares analíticos referentes a cada matriz analisada, aplicando o teste estatístico ANOVA (análise de variância).

Repetir este ensaio (fortificação das amostras de sumos e purés) noutra série de trabalho.

Determinar as recuperações (secção 5.5) e respectivos valores de desvio padrão (S), desvio padrão relativo (DPR%) e variância (S^2).

Aplicar o teste de homogeneidade de variâncias aos dois valores de variância (o mais elevado, purés; o mais baixo, sumo límpido) associados às três matrizes analisadas. Se $VT \leq F(n-1; n-1; 99\%)$ não existem diferenças significativas entre os valores e consequentemente a variabilidade nos valores da recuperação não são influenciados pela matriz. Deste modo pode ser utilizado um limite analítico único.

5.4. Precisão

5.4.1. Repetibilidade

5.4.1.1. Método cromatográfico (HPLC-UV)

Analisar por HPLC-UV 10 soluções padrão de três níveis de concentração (baixo, intermédio e elevado): 8 µg/L ($\pm 3,2$ µg /kg), 25 µg/L (± 10 µg /kg) e 100 µg/L (± 40 µg/kg), num total de 30 réplicas. Determinar o desvio padrão relativo para cada nível de concentração.

5.4.1.2. Método global (SPE-HPLC-UV)

Para avaliar a repetibilidade do método global, SPE-HPLC-UV, analisar as 10 amostras fortificadas para cada nível de concentração, 5 µg/kg, 28 µg/kg e 40 µg/kg, nas 3 matrizes: sumo límpido, sumo turvo e puré de maçã. As amostras fortificadas foram analisadas de acordo com as condições indicadas na tabela V.1 e V.3. Determinar o

desvio padrão relativo das recuperações da patulina para cada nível de concentração e para cada matriz.

5.4.2. Precisão intermédia

5.4.2.1. Método cromatográfico (HPLC-UV)

Analisar por HPLC-UV 5 soluções padrão para cada um de três níveis de concentração em cada série de trabalho (8 µg/L, 25 µg/L e 100 µg/L), as quais foram analisadas em séries de trabalho independentes (3 dias: 5 análises/dia). Determinar o desvio padrão relativo das quinze determinações para cada nível de concentração.

5.4.2.2. Método global (SPE-HPLC-UV)

A precisão intermédia do método global, SPE-HPLC-UV, foi estudada em 3 matrizes: sumo límpido, sumo turvo e puré de maçã. Para cada matriz e nível de fortificação (5 e 28 µg/kg) preparar no mínimo 18 réplicas as quais foram analisadas em 3 séries de trabalho independentes (mínimo: 3x6 réplicas). Determinar o desvio padrão relativo das recuperações do número total de ensaios (mínimo 18 réplicas). Avaliar em simultâneo a repetibilidade em cada dia de trabalho, determinando o desvio padrão relativo das recuperações da série de trabalho (amostras analisadas no mesmo dia).

5.5. Estudos de recuperação

Para avaliar as interferências de matriz na análise de patulina por SPE-HPLC-UV efectuar ensaios de recuperação em diferentes matrizes, incluindo sumo límpido, sumo turvo e puré à base de maçã.

Efectuar os ensaios de recuperação em condições de repetibilidade e de precisão intermédia.

Em condições de repetibilidade fortificar cada matriz com 3 níveis de fortificação (5, 28 e 40 µg/kg) e analisar no mínimo 6 réplicas (preparadas de forma independente).

Em condições de precisão intermédia, fortificar cada matriz com 2 níveis de fortificação (5 e 28 µg/kg) e analisar no mínimo 6 réplicas (preparadas de forma independente, analisadas em três séries de trabalho independentes (6 réplicas/dia; 3 dias diferentes).

Analisar as amostras nas condições descritas nas tabelas V.1 e V.3. e em cada série de trabalho efectuar a calibração instrumental com as 5 soluções padrão de calibração de patulina.

Determinar a percentagem de recuperação R (%) de acordo com a equação 15:

$$R(\%) = \frac{C_a}{C_T} \times 100 \text{ (equação 15)}$$

Em que

C_a Concentração de patulina na amostra fortificada, determinada experimentalmente ($\mu\text{g}/\text{kg}$.)

C_T Concentração teórica de patulina na amostra fortificada ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

5.6. Exactidão

A exactidão do método de SPE-HPLC-UV foi determinada através da análise de materiais de referência e da participação em ensaios interlaboratoriais.

5.6.1. Análise de materiais de referência

Efectuar ensaios de recuperação em materiais de referência nas diferentes matrizes, incluindo sumo límpido, sumo turvo e puré à base de maçã.

Para cada matriz analisar 3 réplicas preparadas de forma independente nas condições descritas nas tabelas V.1 e V.3.

Determinar o erro relativo associado a cada material de referência.

5.6.2. Ensaios interlaboratoriais

De acordo com a norma ISO 5725-2 (170) uma das formas de avaliar a reprodutibilidade interlaboratorial, é através da participação em ensaios interlaboratoriais.

Durante a realização do presente trabalho, o DAN (Departamento de Alimentação e Nutrição) participou em ensaios interlaboratoriais organizados pelo “Food Analysis Performance Assessment Scheme” (FAPAS) e pelo “Bureau InterProfessionnel d’Etude

Analytique (Bipea), os quais, incluíram sumos lípidos, sumos turvos, bebidas para crianças, purés e compotas contaminadas com patulina.

Os valores de “z-score” determinados pelas entidades oficiais dos ensaios interlaboratoriais foram posteriormente avaliados pelo laboratório.

5.7. Limites de determinação do método global (LD)

Após os estudos de recuperação é possível calcular o limite de determinação (LD) do método SPE-HPLC-UV, para cada uma das matrizes estudadas. A determinação do LD é calculada de acordo com a seguinte equação 16:

$$LD = C_p \times \frac{100}{R(\%)} \text{ (equação 16)}$$

Em que

C_p Concentração de patulina no padrão de calibração ($\mu\text{g/L}$), correspondente ao padrão de menor concentração.

$R(\%)$ Percentagem de recuperação.

6. Análise de amostras

6.1. Selecção das amostras

Foram adquiridas 148 amostras entre Maio de 2007 e Dezembro de 2008, em supermercados e hipermercados, lojas de produtos biológicos, farmácias e outros locais de venda de produtos alimentares de Lisboa e da margem sul do Tejo (Almada e Seixal).

As amostras recolhidas são maioritariamente amostras destinadas à alimentação infantil, abrangendo a faixa etária compreendida entre os 4 meses e os 3 anos, tendo sido também incluídas amostras de sumo à base de maçã destinadas aos consumidores em geral. As amostras foram agrupadas por grupo etário e por tipo de matriz (Tabela V.6):

No anexo 1 apresentam-se as características dos sumos e purés incluídos no presente estudo.

As amostras foram seleccionadas de acordo com os seguintes critérios:

- Puré de fruta com teor de maçã igual ou superior a 50%, rotuladas especificamente para lactentes e crianças jovens, representando a grande maioria das marcas disponíveis no mercado, no período em que foram adquiridas.
- Sumos 100% maçã rotulados especificamente para crianças.
- Sumos de maçã, límpidos e turvos, com teor de maçã igual ou superior a 50% (biológicos e convencionais) destinados aos consumidores em geral.

Tabela V.6: Amostras agrupadas de acordo com o grupo etário e tipo de matriz.

Grupo etário	Matriz	Descrição
Lactentes e crianças jovens	Puré à base de maçã	Purés de fruta com 100% maçã ou com maçã e outros frutos, biológicos e convencionais, incluindo também nalguns casos cereais e baunilha
Lactentes e crianças jovens	Sumo límpido 100% maçã	Sumo límpido 100%, preparado a partir de concentrado de maçã
Adultos/consumidores em geral	Sumos límpidos	Sumo límpido 100%, preparado a partir de concentrado de maçã
Adultos/consumidores em geral	Sumos turvos	Sumos turvos com 100% maçã ou com maçã e outros frutos, biológicos e convencionais

De forma a obter uma amostra representativa foram adquiridas várias unidades da mesma amostra, pertencentes ao mesmo lote, de forma a perfazer pelo menos 600 g de puré ou 600-1000 mL de sumo.

Na maioria dos casos foram adquiridos e analisados 2 lotes de cada produto.

As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente ou a 5 ± 3 °C, de acordo com as indicações do rótulo, até à sua abertura e armazenadas a -20 °C após abertura.

Todas as amostras foram analisadas dentro do respectivo prazo de validade.

6.2. Toma de ensaio

Para preparar a toma de ensaio de purés misturar o conteúdo de 7 embalagens com peso unitário de 90 g ou 6 embalagens com peso unitário de 120 g, de modo a perfazer no mínimo, 600 g. Após homogeneização retirar 10 g para análise e congelar cerca de 50 g de amostra a -20 °C.

No caso dos sumos utilizar uma embalagem de 1000 mL ou pelo menos 3 embalagens de 200 mL. Após homogeneização retirar 10 g para análise e congelar cerca de 50 g de amostra a -20 °C.

6.3. Análise de patulina pelo método de SPE-HPLC-UV

A patulina é analisada pelo método do padrão externo. As condições cromatográficas são as estabelecidas nas tabelas V.1, V.2 e V.3.

Em cada série de trabalho injectar os 5 padrões de calibração da patulina, representativos da gama de trabalho (8, 16, 25, 50 e 100 µg/L) e traçar a curva de calibração, área vs concentração de patulina (µg/L).

Em cada série de trabalho seguir a seguinte ordem de injeção:

- Branco cromatografico (fase móvel)
- Branco de solvente (água a pH=4)
- Padrões de calibração (8, 16, 25, 50 e 100 µg/L)
- Controlo cromatográfico 1 (± 8 µg/L)
- Controlo de fortificação (± 40 µg/L)
- Amostras
- Duplicados
- Ensaio de recuperação
- Controlo cromatográfico 2 (± 25 µg/L)

Na análise dos extractos, identificar o pico da patulina na amostra, por comparação do respectivo tempo de retenção (t_R) com o tempo de retenção do pico cromatográfico da patulina na solução padrão de calibração. Determinar a concentração de patulina na amostra de acordo com o descrito na secção 6.5 (cálculos).

6.4. Controlo de qualidade interno (CQI)

Em cada série de trabalho analisar um duplicado e efectuar um ensaio de recuperação por cada 20 amostras. Analisar um branco, dois controlos cromatográficos (8 e 25 µg/L) e um controlo de fortificação (40 µg/L) por série de trabalho. Esporadicamente são intercaladas na série de trabalho, amostras de material de referência (FAPAS ou Bipea).

Registar o valor dos controlos, dos duplicados, das recuperações, do declive e da ordenada na origem nas cartas de controlo. Os valores de cada um destes parâmetros devem estar compreendidos dentro das linhas de controlo das respectivas cartas de controlo. No entanto, as séries de trabalho devem ser reavaliadas, quando os valores de qualquer um dos parâmetros estiverem entre as linhas de aviso e as linhas de controlo, principalmente, quando há uma tendência. Nestes casos, averiguar as causas de erro e desenvolver acções correctivas.

Quando qualquer parâmetro apresentar valores fora das linhas de controlo, repetir o ensaio inerente a esse parâmetro e avaliar de novo a série de trabalho. No caso de se confirmar fora de controlo, rejeitar e repetir a série de trabalho.

O valor do branco deve ser inferior ao limite de detecção cromatográfico (2,0 µg/L).

Nos ensaios de rotina devem ser rejeitadas todas as curvas de calibração com um coeficiente de determinação (R^2) inferior a 0,995.

As amostras devem ser lidas por interpolação na curva de calibração (dentro da gama de trabalho).

Na análise de duplicados, se as amostras seleccionadas para o ensaio apresentarem uma concentração inferior ao limite de quantificação para o método em análise, o resultado obtido é considerado nulo e a diferença de duplicados também é nula ($DD\% = 0$).

A partir dos resultados da análise dos materiais de referência, calcular o erro (%) e utilizar este parâmetro para avaliar a exactidão do método

6.5. Cálculos

A partir da área do pico de patulina na amostra e por interpolação na curva de calibração (área vs concentração), calcular a respectiva concentração (µg/L). Calcular o teor de patulina presente na amostra, em µg/kg, através da equação 16.

$$Patulina (\mu\text{g/kg}) = C (\mu\text{g/L}) \times \frac{v_3 (\text{mL}) \times v_1 (\text{mL})}{v_2 (\text{mL}) \times m_1 (\text{g})} \text{ (equação 16)}$$

Se não houver alteração na massa de amostra, volume de solvente de extracção e alíquota de extracto, a equação pode ser expressa de forma abreviada:

$$Patulina (\mu\text{g/kg}) = C (\mu\text{g/L}) \times \frac{1 \times 10}{2,5 \times 10} \text{ (equação 16)}$$

$$Patulina (\mu\text{g/kg}) = C (\mu\text{g/L}) \times 0,4 \text{ (equação 16)}$$

Em que:

- C Concentração da solução de ensaio calculada a partir da curva de calibração.
- m_1 Massa da amostra utilizada para análise (10 g).
- v_1 Volume de solvente de extracção (10 mL).
- v_2 Alíquota para SPE (2,5 mL).
- v_3 Volume de solução de água a pH=4 usada para dissolver o extracto (1 mL).

Capítulo VI - Resultados e discussão

1. Estudo da estabilidade da patulina

1.1. Efeito do pH

Na figura VI.1 apresenta-se a variação da concentração da patulina em soluções de igual concentração mas com valores diferentes de pH (4, 5, 6, 7 e 9).

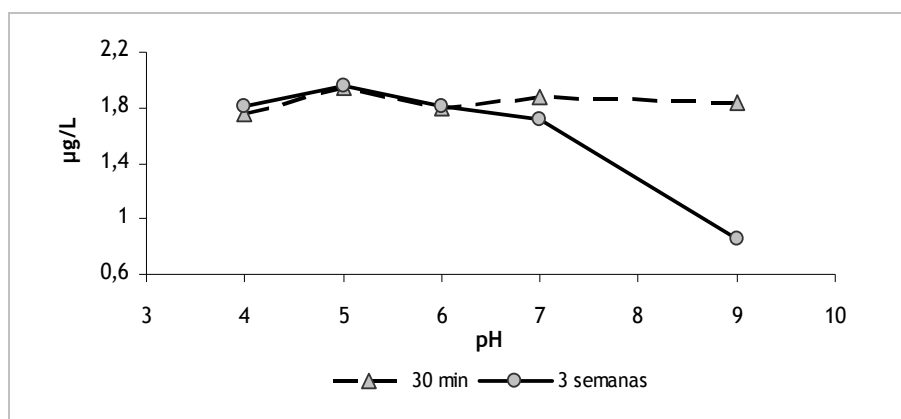


Figura VI.1: Variação da concentração de patulina numa solução padrão (± 2 mg/L), em função do pH da solução e do tempo de armazenamento (30 minutos e 3 semanas).

Considerou-se como valor de “referência”, a concentração de patulina na solução a pH=4 ao fim de 30 minutos, porque é este o pH utilizado no solvente de diluição das soluções aquosas de patulina (água pH=4).

Os valores de concentração das soluções de patulina a pH=4 e a pH=5, 6, 7 e 9 não apresentam uma variação significativa ao fim de 30 minutos.

Os valores de concentração das mesmas soluções conservadas a 4 °C durante 3 semanas mantêm-se idênticos aos anteriores para as soluções a pH=4, 5 e 6, diminuindo ligeiramente a pH=7 e de forma acentuada a pH=9.

Quando analisados como duplicados, os valores aos 30 minutos e às 3 semanas apresentam diferenças de duplicados (DD %) inferiores a 5 % para valores de pH iguais a 4, 5 e 6 e um valor de 8,9% para pH=7. Para valores de pH=9 a diferença de duplicados é de cerca de 74% devido ao decréscimo acentuado da concentração da patulina.

Os resultados apresentados indicam que a concentração de patulina não varia de forma significativa, ao fim de 30 minutos nos valores de pH estudados, sugerindo que a patulina mantida nestas condições apresenta uma boa estabilidade.

Uma vez que o procedimento inicial de extracção de patulina a partir das amostras em condições de pH superiores a 4 demora em média 20 minutos e considerando que, de acordo com os resultados obtidos, a patulina é relativamente estável a pH entre 4 e 9 durante pelo menos 30 minutos, pressupõe-se que é pouco provável que ocorram perdas significativas de micotoxina nesta fase do procedimento analítico.

Estes resultados também demonstram que ao fim de 3 semanas, apenas a solução a pH=9 apresenta uma redução significativa da concentração de patulina, indicando que nestas condições a patulina é mais instável do que para valores de pH mais baixos.

1.2. Efeito da temperatura de conservação

Na tabela VI.1 apresentam-se as variações da concentração de patulina, expressas em termos do erro (%) em amostras fortificadas com patulina (28 µg/kg), conservadas a -20 °C e a 5 °C durante 9 semanas.

Tabela VI.1: Variação da concentração de patulina em função da temperatura de conservação expressa em termos de erro (valor percentual).

Tempo (semanas)	Erro (%)	
	-20 °C	5 °C
0	1,5	1,6
2	-1,6	11
3	-3,8	13
4	1,5	9,4
5	3,7	20
6	-2,2	15
9	2,8	21

A concentração teórica de patulina na amostra foi utilizada como valor de “referência” (tempo zero).

As amostras conservadas a -20 °C durante 9 semanas apresentam pequenas variações da concentração, com desvios entre -3,8 e 3,7%, os quais, são sempre inferiores aos das amostras conservadas a 5 °C.

As amostras conservadas a 5 °C apresentam uma percentagem de erro entre 9,4 e 21%, registando-se um aumento gradual do erro entre a segunda e a nona semana, a qual indica que há uma diminuição da concentração de patulina.

Estes resultados mostram que a temperatura é um factor importante na conservação das amostras e que as amostras devem ser conservadas a -20 °C.

Sendo assim, estabeleceu-se como requisito de conservação das amostras após abertura, -20 °C durante um período máximo de 9 semanas.

1.3. Efeito do tempo (curva de calibração)

Para estudar o efeito do tempo de conservação sobre a concentração de patulina, um conjunto de 5 padrões de calibração foi mantido a 4 °C (5 ± 3 °C) e reanalisado semanalmente. Na tabela VI.2 apresentam-se os valores de declive, ordenada na origem e coeficiente de determinação de todas as curvas de calibração obtidas ao longo de 9 semanas de conservação.

Tabela VI.2: Declive, ordenada na origem e coeficiente de determinação das curvas de calibração obtidas a partir da análise dos 5 padrões de calibração conservados a 5 ± 3 °C, durante 9 semanas.

Semana:	0	2	3	4	5	6	7	8	9
Declive	1064	1097	1080	1091	1076	1067	1070	1054	1034
Ordenada na origem	696	-394	142	54	109	351	2,00	-34,0	504
Coeficiente de determinação	0.9994	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9998	0.9999	0.9999	0.9998

Os declives mantêm-se constantes ao longo das várias semanas, deste modo, não há alteração da sensibilidade do método ao longo do período de conservação. A ordenada na origem varia entre -394 e 696 e o coeficiente de determinação (R^2) mantém valores superiores a 0,999 até ao final do período de conservação.

Na tabela VI.3 apresentam-se as concentrações de patulina de três réplicas de dois controlos (8 e 25 µg/L), analisados em várias séries de trabalho mas cuja concentração foi determinada em função das várias equações da recta (9 semanas = 9 equações da

recta). Apresenta-se também a concentração média das nove determinações, desvio padrão relativo (DPR%), valor máximo (Máx) e valor mínimo (Mín).

Tabela VI.3: Concentração média, desvio padrão relativo, máximo e mínimo dos controlos calculados com base nas equações da recta dos estudos de estabilidade da curva de calibração.

	Concentração ($\mu\text{g/L}$)					
	8			25		
Réplica	1	2	3	1	2	3
Conc. Média (n=9)	8,0	8,0	8,6	26	24	25
DPR%	3,0	3,0	2,8	1,4	1,4	1,4
Máx	8,3	8,3	8,9	27	25	25
Mín	7,6	7,5	8,1	26	24	24

Na figura VI.2 apresentam-se os resultados da amplitude (%), expressa como diferença de duplicados (DD %), calculada a partir da concentração de patulina nos padrões de controlos de 8 e 25 $\mu\text{g/L}$.

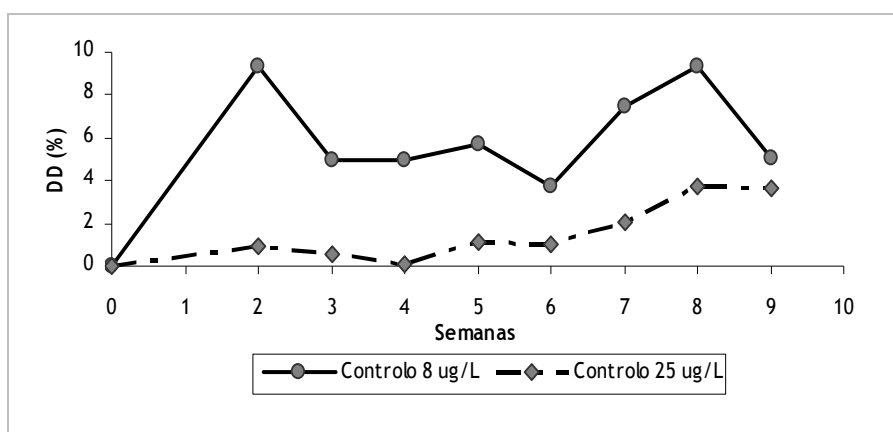


Figura VI.2: Diferença de duplicados para os controlos 8 e 25 $\mu\text{g/L}$. A concentração de patulina foi calculada a partir das várias equações da recta dos padrões de calibração conservados a 5 ± 3 °C.

A diferença de duplicados para os dois níveis de concentração foi inferior a 10% ao longo das nove semanas de trabalho. Deste modo, os padrões de calibração podem ser utilizados ao longo de nove semanas (armazenados a 5 ± 3 °C) não havendo a necessidade de os preparar diariamente.

1.4. Efeito das condições de evaporação (temperatura, pressão e tempo)

1.4.1. Efeito da temperatura e pressão

A figura VI.3 apresenta resultados da recuperação de uma solução de patulina em função da pressão de azoto, para 3 valores de temperatura de evaporação.

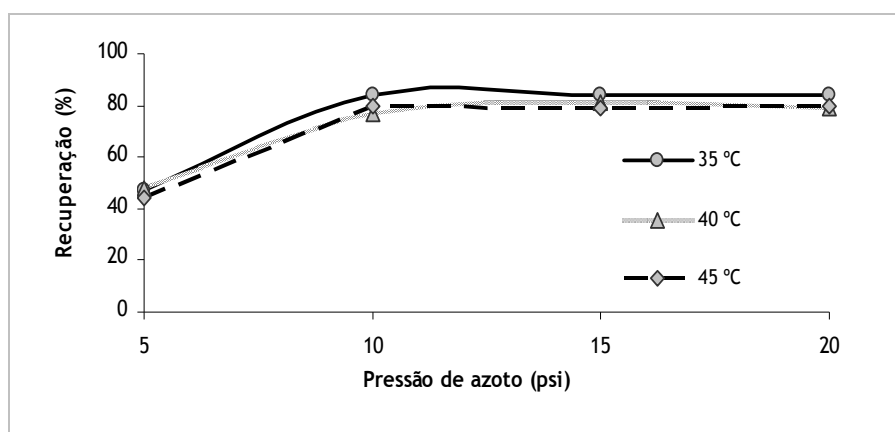


Figura VI.3: Efeito de diferentes condições de pressão de azoto e temperatura sobre a recuperação da patulina (n=5).

A recuperação aumenta com o aumento da pressão. Para as três temperaturas estudadas e para uma pressão de 5 psi, os valores de recuperação são baixos variando entre 44 e 48%. Para as temperaturas estudadas e pressões de 10, 15 e 20 psi a recuperação aumenta de forma acentuada e apresenta valores compreendidos entre 77 e 84%. Estes resultados indicam que a pressão de azoto afecta de forma significativa a recuperação de patulina, existindo diferenças estatisticamente significativas entre a recuperação obtida a 5 psi e a recuperação obtida para os restantes valores de pressão de azoto ($p < 0,01$).

Relativamente à influência da temperatura de evaporação verifica-se que, para cada valor de pressão, a variação da temperatura entre 35 e 45 °C provoca apenas ligeiras

alterações na recuperação, indicando que a temperatura de evaporação não é um factor que afecte significativamente a recuperação ($P\text{ value}=0,586$).

1.4.2. Efeito do tempo de evaporação

A figura VI.4 apresenta os resultados obtidos para a recuperação de uma solução de patulina sujeita a diferentes tempos de evaporação.

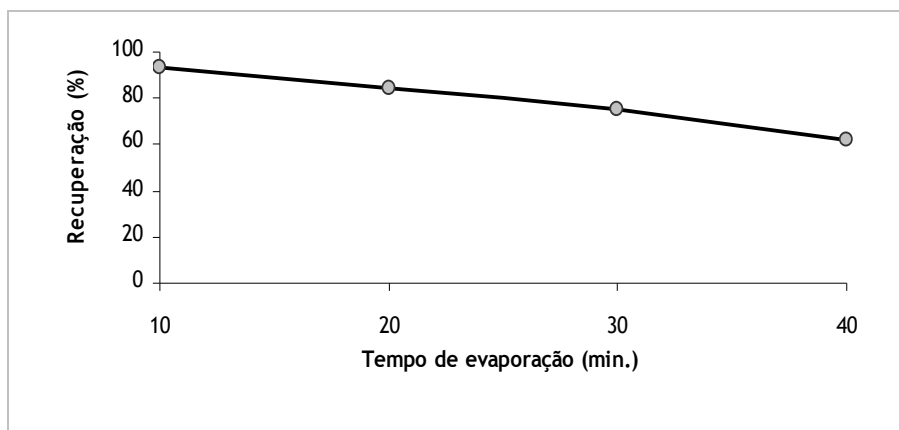


Figura VI.4: Efeito do tempo de evaporação sobre a recuperação da patulina (40 °C e 15 psi), $n=5$.

Há uma diminuição da recuperação à medida que o tempo de evaporação aumenta. O valor mais elevado de recuperação (93%) foi obtido para um tempo de evaporação de 10 minutos, o que, no entanto, não é suficiente para evaporar completamente o solvente, e deste modo, não pode ser utilizado. Para um tempo de evaporação de 20 minutos a recuperação é de 84% e há a evaporação completa do solvente. Os tempos de evaporação de 30 e 40 minutos ultrapassam largamente o tempo necessário de evaporação, originam perdas de analito e consequentemente originam valores de recuperação mais baixos. Estes resultados indicam que a variação do tempo de evaporação afecta de forma significativa a recuperação de patulina ($p < 0,01$).

1.4.3. Análise de uma amostra nas condições de evaporação escolhidas

A análise de cinco amostras de sumo límpido fortificadas com 28 $\mu\text{g/kg}$, nas condições de evaporação optimizadas (40° C, 15 psi e 20 minutos, no máximo) originou uma recuperação média de 84%, com um desvio padrão relativo de 7,0%.

2. Estudos de selectividade/especificidade

Um dos principais interferentes na análise cromatográfica da patulina por HPLC-UV é o 5-hidroximetilfurfural (HMF). Para avaliar se as condições cromatográficas permitiam uma boa resolução cromatográfica entre os picos do HMF e da patulina, injectaram-se soluções padrão individuais dos dois compostos e uma solução padrão conjunta. A figura VI.5 apresenta os respectivos cromatogramas.

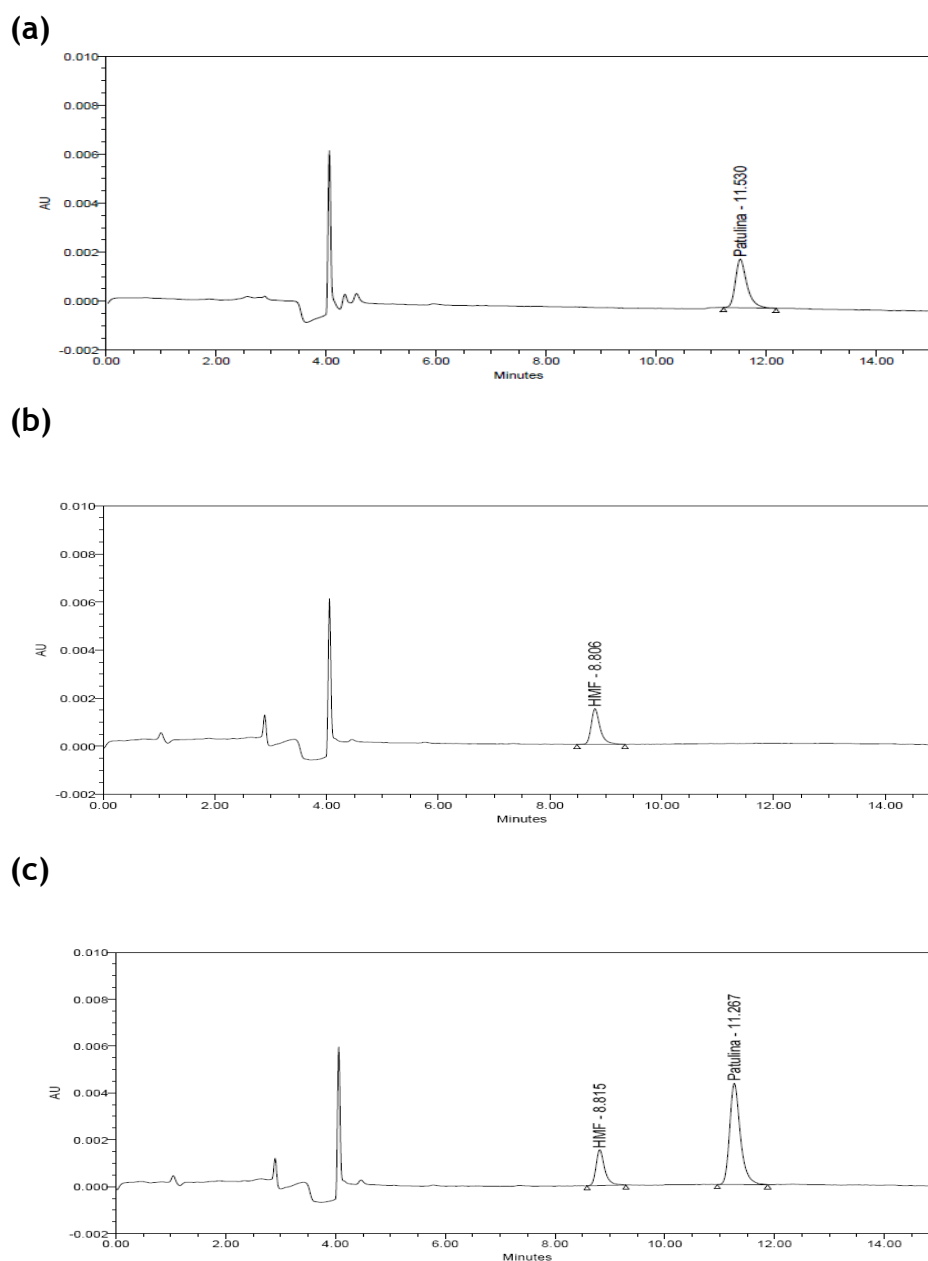
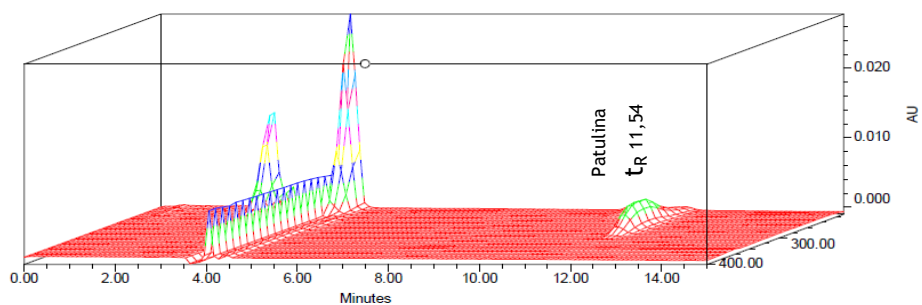


Figura VI.5: Cromatogramas de soluções padrão de patulina a 25 µg/L (a), HMF (5-hidroximetilfurfural) a 50 µg/L (b) e HMF+patulina a 50 µg/L (c).

Tal como representado na figura VI.5 (c), o HMF ($t_R = 8,815$ min) e a patulina ($t_R = 11,267$ min) apresentam uma boa resolução cromatográfica, logo, o método é selectivo. A selectividade do método também foi avaliada através da análise da pureza espectral do pico do padrão de patulina e de uma amostra de sumo turvo contaminada com patulina (figura VI.6 e figura VI.7).

(a)



(b)

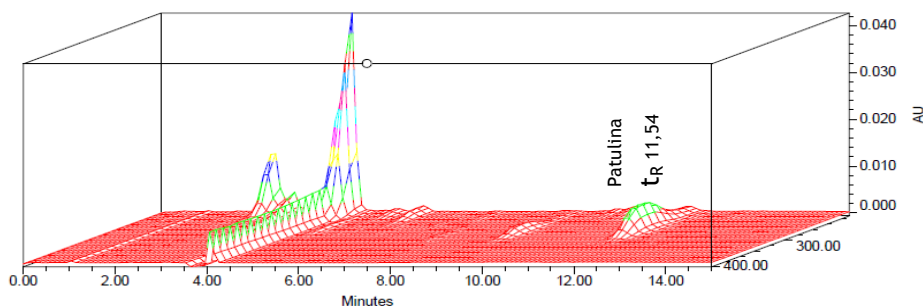
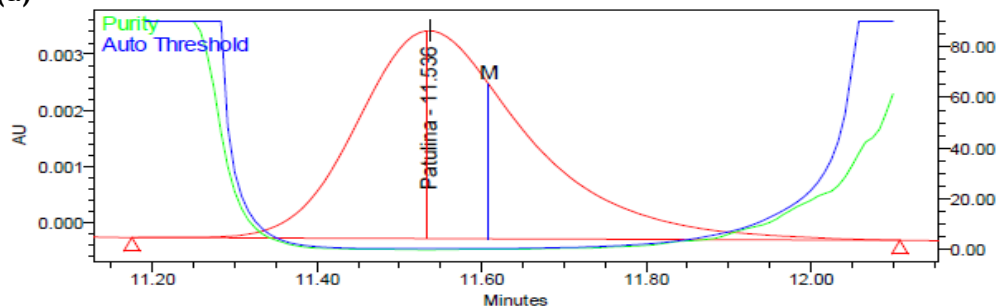


Figura VI.6: Espectro tridimensional de um padrão de patulina a 50 µg/L (a) e de uma amostra de sumo turvo contaminada (b) analisada por HPLC com detector de díodos.

(a)



(b)

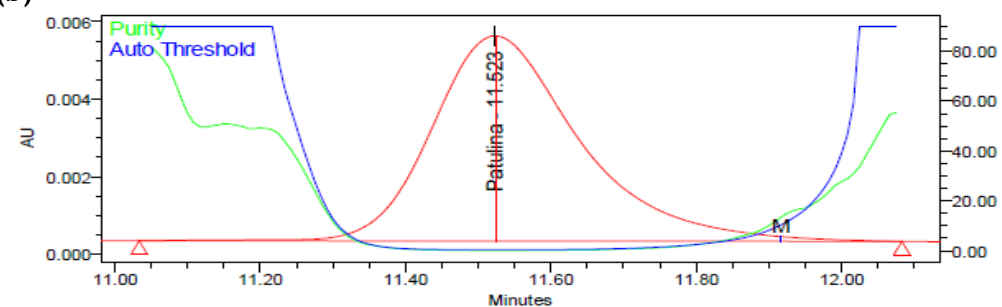


Figura VI.7: Avaliação da pureza espectral do pico de um padrão de patulina a 50 µg/L (a) e de uma amostra de sumo turvo contaminada (b).

O padrão de patulina e a amostra de sumo turvo contaminada apresentam máximos de absorvência nos comprimentos de onda de 276 nm, confirmando o comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvência descrito na literatura para a patulina.

O ângulo de pureza (“purity”) é de 0,487 e de 0,500 e o ângulo de ruído (“purity threshold”) é de 0,710 e de 0,639, para o padrão e para a amostra contaminada, respectivamente.

Em ambos os casos o valor do ângulo de pureza é inferior ao valor do ângulo de ruído entre o início e o fim do pico, indicando que essa é uma zona em que há pureza espectral do pico.

3. Linearidade e gama de trabalho

3.1. Linearidade

A tabela VI.4 mostra os resultados iniciais dos testes aplicados para a avaliação da linearidade do método, para a gama de concentrações de 2 a 100 µg/L.

Tabela VI.4: Avaliação da linearidade do método de HPLC-UV para a análise da patulina.

PARÂMETRO	RESULTADO
Número de pontos de calibração (N)	17
Intervalo de concentrações (µg/L)	2 - 100
Equação da recta	$y = 1114,17 x + 531,93$
Coeficiente de determinação (R^2):	0,9996
Coeficiente de variação do método (CV_m , %)	2,1
Análise de resíduos (%)	[-12 -8,6]
Teste das áreas normalizadas (%)	[97 - 120]
Teste de RIKILT (%)	[94 - 116]
Teste de Mandel, $VT \leq F(1, N-3)$, 95%	$0,09 < 4,6$
Limite de detecção (LOD)	2,0
Limite de quantificação (LOQ)	6,6

Os resultados mostram que os pontos apresentam uma boa correlação ($R^2 \geq 0,995$) mas o intervalo de concentrações não é linear. O coeficiente de determinação (R^2) bem como o coeficiente de variação do método (CV_m) cumprem os critérios de aceitação mas a análise de resíduos, o teste das áreas normalizadas e o teste de RIKILT não cumprem os respectivos critérios de aceitação.

O limite de quantificação provisório (determinado a partir do declive e da ordenada na origem) é superior ao primeiro ponto da curva de calibração ($2 \mu\text{g/L}$), indicando que os primeiros valores da recta de calibração não estão bem ajustados. O primeiro nível de concentração estudado, situado acima do limite de quantificação é o padrão de $8 \mu\text{g/L}$.

A gama de concentrações da curva de calibração foi reduzida de $2\text{-}100 \mu\text{g/L}$ para $8\text{-}100 \mu\text{g/L}$. Preparam-se e analisaram-se 9 novas soluções padrão de patulina com concentrações compreendidas entre 8 e $100 \mu\text{g/L}$ e efectuaram-se de novo todos os testes estatísticos de avaliação da linearidade.

A figura VI.8 apresenta os resultados dos testes estatísticos para o estudo da linearidade na gama de concentrações entre 8 e $100 \mu\text{g/L}$.

Os resultados indicam que o método é linear para o intervalo de concentrações estudado ($8\text{-}100 \mu\text{g/L}$) apresentando um bom R^2 (0,9986), $CV_m < 5$ (3,0), valor teste (VT) inferior ao valor tabelado F de Fisher/Snedecor ($F(1;6;95\%)=5,99$). Os testes da análise de resíduos, das áreas normalizadas e RIKILT apresentaram uma variação inferior a 10%.

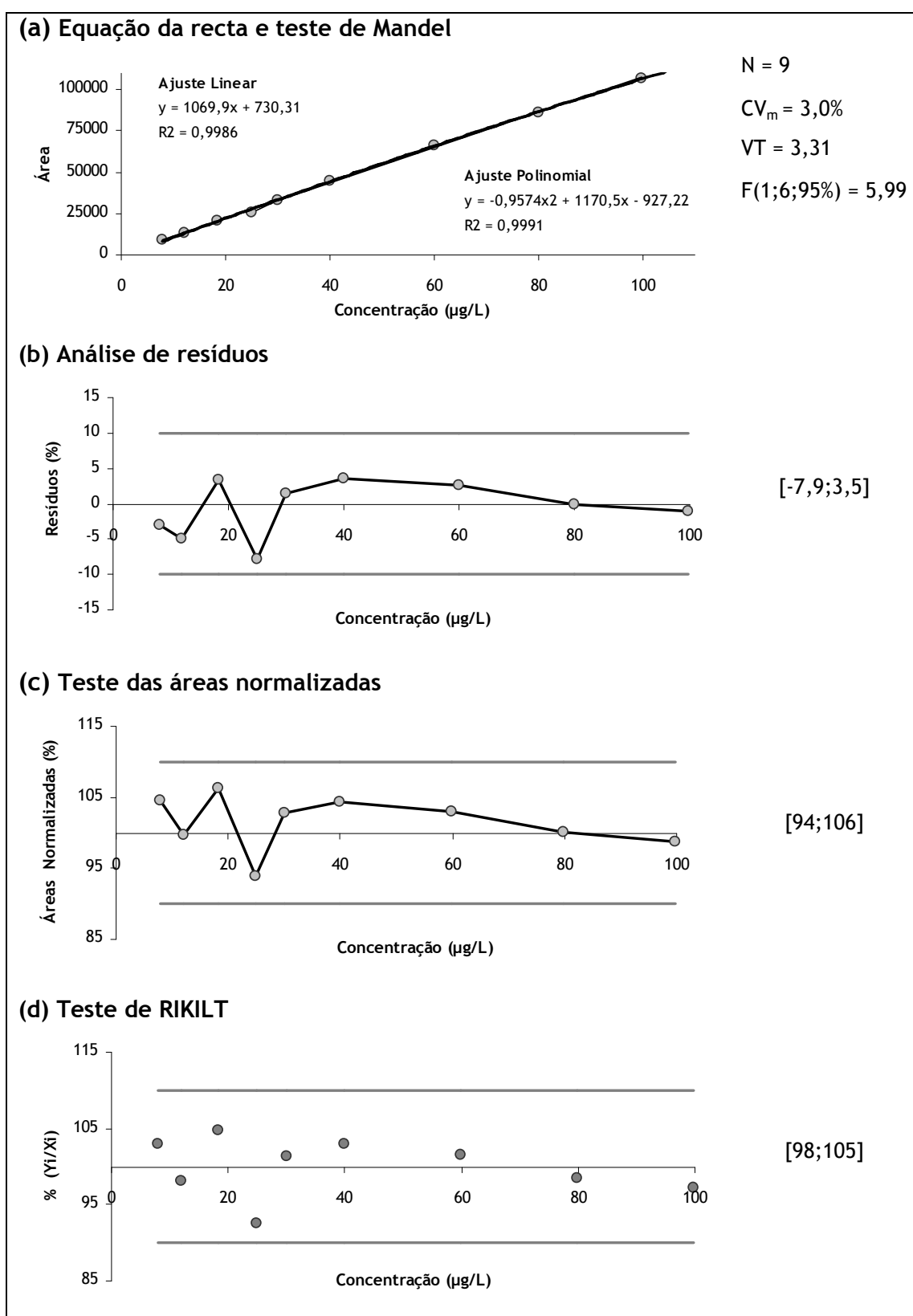


Figura VI.8: Testes estatísticos para estudo da linearidade. Curva de calibração (a), análise de resíduos (b), áreas normalizadas (c) e teste de RIKILT (d).

3.2. Gama de trabalho

Após a definição do intervalo de linearidade aplicou-se o teste de homogeneidade de variâncias aos extremos de concentração deste intervalo, nomeadamente, 8 e 100 µg/L. Como o valor de VT (4,2) foi inferior ao valor tabelado (5,4) de F (9,9; 99%), a gama de trabalho está bem ajustada.

4. Limiares analíticos (LOD e LOQ)

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados com base na recta de calibração e em condições de repetibilidade para o método cromatográfico (HPLC-UV). Estes limiares analíticos foram também determinados em condições de repetibilidade para o método global (SPE-HPLC-UV).

4.1. Método cromatográfico (HPLC-UV)

A tabela VI.5 apresenta os resultados obtidos para os limiares analíticos do método de HPLC-UV.

Tabela VI.5: Limiares analíticos do método de HPLC-UV.

	Recta de calibração	Em condições de repetibilidade
LOD (µg/L)	2,0	2,1
LOQ (µg/L)	6,7	6,9

Os valores de LOD e LOQ determinados com base na recta de calibração são 2,0 e 6,7 µg/L correspondendo a concentrações de patulina de 0,80 µg/kg e 2,7 µg/kg, respectivamente. Os mesmos limites calculados com base em estudos de repetibilidade são de 2,1 e 6,9 µg/L e reflectem concentrações de patulina de 0,84 µg/kg e 2,8 µg/kg, respectivamente.

4.2. Método global (SPE-HPLC-UV)

Apresentam-se na tabela VI.6 os limiares analíticos do método global, determinados a partir dos ensaios de repetibilidade em sumo límpido, sumo turvo e puré de maçã fortificados com um nível de patulina correspondente a 5 µg/kg.

Tabela VI.6: Limiares analíticos (LOD e LOQ) para as matrizes sumo límpido, sumo turvo e puré, fortificadas com 5 µg/kg de patulina (n= 10).

	Sumo límpido	Sumo turvo	Puré
LOD (µg/kg)	0,9	0,8	0,8
LOQ (µg/kg)	2,9	2,6	2,7

Os valores de LOD e LOQ obtidos para as 3 matrizes variam entre 0,8 - 0,9 µg/kg e entre 2,6 - 2,9 µg/kg, respectivamente. Estes valores são muito semelhantes aos valores de LOD e LOQ determinados para o método de HPLC-UV, utilizando soluções padrão de patulina.

A tabela VI.7 apresenta o estudo da homogeneidade de variâncias aplicado às recuperações nas matrizes em estudo, para avaliar se as interferências de matriz são diferentes e se há necessidade de ter limiares analíticos diferentes para cada matriz.

Tabela VI.7: Teste de homogeneidade de variâncias das recuperações das matrizes sumo límpido, sumo turvo e puré, fortificadas com 5 µg/kg de patulina (n ≅ 20).

	Sumo límpido	Sumo turvo	Puré
n	23	21	22
Recuperação (%)	78	72	61
Variância (S ²)	31	30	32
VT=1,08 < F=2,92 F(n-1, n-1, 99%)			

Como o valor VT é inferior ao valor F tabelado não existem diferenças significativas entre os valores obtidos para as várias matrizes. Deste modo, podemos ter um limiar analítico único, o qual é a média dos três limiares analíticos, isto é, 2,7 µg/kg de

patulina (LOQ) ou adoptar como LOD e LOQ os valores mais elevados obtidos em cada matriz, ou seja os valores de 0,9 e 2,9, respectivamente. Escolheu-se o valor mais elevado para limite de quantificação, isto é, 2,9 µg/kg.

Deste modo, o método de SPE-HPLC-UV permite quantificar concentrações de patulina muito inferiores ao limite máximo permitido nos alimentos à base de maçã destinados a lactentes e crianças jovens (10 µg/kg).

Os limiares analíticos estabelecidos durante a validação do método (LOD=0,9 µg/kg e LOD=2,9 µg/kg) são idênticos ou inferiores aos referidos por outros autores para métodos de SPE-HPLC-UV. Iha e colaboradores (152) determinaram valores de LOD e LOQ de 4 e 10 µg/L, respectivamente, Funes e colaboradores (151) utilizaram um LOD de 3,8 µg/kg e um LOQ de 6,3 µg/kg e Spadaro e colaboradores (74) referem valores de 1,04 µg/kg e de 1,57 µg/kg para LOD e LOQ, respectivamente.

5. Repetibilidade e precisão intermédia

5.1. Método cromatográfico (HPLC-UV)

A tabela VI.8 apresenta os resultados do estudo da repetibilidade e da precisão intermédia do método cromatográfico, expressos em termos de desvio padrão relativo.

Tabela VI.8: Repetibilidade e precisão intermédia do método de HPLC-UV expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR%).

Concentração, µg/L (patulina)	Repetibilidade n=5	Precisão intermédia n=15, 3 dias
	DPR (%)	
8	3,7	4,7
25	3,8	6,5
100	2,2	4,0

Nos ensaios repetibilidade os valores de DPR variam entre 2,2 e 3,8% e nos ensaios de precisão intermédia variam entre 4,0 e 6,5%.

Considera-se que o método de HPLC-UV é preciso uma vez que apresenta valores de DPR% inferiores a 10%, quer em condições de repetibilidade, quer em condições de precisão intermédia, embora sejam ligeiramente superiores nestas últimas condições.

5.2. Método global (SPE-HPLC-UV)

A tabela VI.9 apresenta os valores de DPR% determinados com base nos resultados de recuperação das amostras fortificadas analisadas em condições de repetibilidade e de precisão intermédia.

Tabela VI.9: Repetibilidade e precisão intermédia do método global (SPE-HPLC-UV) expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR%).

Amostras	Repetibilidade, n=6			Precisão intermédia n=18, 3 dias	
	Nível de fortificação (µg/kg)				
	5	28	40	5	28
	DPR _r (%)			DPR (%)	
Sumos límpidos	7,9	10	8,3	7,2	8,3
Sumos turvos	7,4	5,6	4,0	7,6	8,3
Purés	4,1	6,2	6,3	9,3	10

Os valores de desvio padrão relativo do método global em condições de repetibilidade (DPR_r) variam entre 4,0 e 10%. O valor máximo registou-se na matriz sumo límpido para a concentração de 28 µg/kg.

Em condições de precisão intermédia os valores de DPR% variam entre 7,2 e 10% e o valor máximo registou-se em purés, para o nível de 28 µg/kg.

Considera-se que o método de SPE-HPLC-UV é preciso uma vez que apresenta valores de DPR_r% inferiores ou iguais a 10%, quer em condições de repetibilidade, quer em condições de precisão intermédia.

Tal como esperado, o método cromatográfico é mais preciso que o método global, quer em condições de repetibilidade, quer em condições de precisão intermédia. Estes

valores são inferiores ou iguais a 10%, o que está de acordo com os valores apresentados por outros autores. Iha e colaboradores (152) obtiveram valores de DPR% inferiores a 7,7% em sumos, para níveis de fortificação de 7, 39 e 215 $\mu\text{g/L}$; Funes e colaboradores (151) referem, para um nível de contaminação de 10 $\mu\text{g/kg}$, um DPR% de 5,2%. Por sua vez, Spadaro e colaboradores (74) apresentam valores de DPR% que variam entre 4,7 e 7,7%, para um nível de fortificação de 30 $\mu\text{g/kg}$.

Os desvio padrão relativo da repetibilidade ($\text{DPR}_r, \%$) ou coeficiente de variação da repetibilidade ($\text{CV}_r, \%$) cumprem os requisitos do Regulamento 401/2006 de 23 de Fevereiro, no qual, o CV_r deve ser inferior ou igual a 30% para teores de patulina inferiores a 20 $\mu\text{g/Kg}$ e inferior ou igual a 20% para teores de patulina entre 20 -50 $\mu\text{g/Kg}$.

6. Estudos de recuperação

Para estudar o efeito de matriz analisaram-se amostras de sumo límpido, sumo turvo e puré à base de maçã, fortificadas com 5, 28 e 40 $\mu\text{g/kg}$, em condições de repetibilidade e amostras fortificadas com 5 e 28 $\mu\text{g/kg}$ em condições de precisão intermédia (3 séries de trabalho em dias diferentes).

As tabelas VI.10 e VI.11 apresentam os resultados das recuperações médias obtidas para cada matriz, em condições de repetibilidade e de precisão intermédia respectivamente.

Tabela VI.10: Estudos de recuperação em várias matrizes alimentares em condições de repetibilidade.

Fortificação ($\mu\text{g/kg}$)	Recuperação (%), n=6, por matriz			Recuperação (%), n=18, para 3 matrizes			
	Sumos límpidos	Sumos turvos	Purés	Média	Máx.	Min.	DPR%
5	77	75	56	70	87	53	15
28	64	75	56	66	81	51	14
40	66	76	72	71	80	59	8,6

Os valores médios de recuperação obtidos em condições de repetibilidade para todos os níveis de fortificação e para todas as matrizes variam entre 56 e 77%. O valor de recuperação mais elevado foi obtido em sumo límpido fortificado com 5 µg/kg e o mais baixo em purés fortificados com 5 e 28 µg/kg. A dispersão dos valores de recuperação é menor para o nível de fortificação mais elevado (DPR < 10%).

Comparando as recuperações entre as 3 matrizes para cada nível de fortificação verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre as recuperações obtidas nas várias matrizes ($p < 0,01$).

Para o nível de 5 µg/kg os purés apresentam uma recuperação significativamente inferior às dos sumos límpidos e turvos.

Para o nível de 28 µg/kg os sumos turvos apresentam uma recuperação significativamente superior às das restantes matrizes.

No nível de fortificação de 40 µg/kg, os sumos turvos apresentam uma recuperação significativamente superior à dos sumos límpidos límpidos.

Os valores de recuperação do método em condições de repetibilidade para o nível de fortificação de 5 µg/kg e para as três matrizes estudadas, cumprem os requisitos do regulamento 401/2006 ($R=50-120\%$, para concentrações de patulina inferiores a 20 µg/kg). Para o nível de fortificação de 28 µg/kg, no caso dos sumos límpidos e purés, não são cumpridos os requisitos do Regulamento 401/2006 ($R=70-105\%$ para concentrações \geq a 20 µg/kg e \leq a 50 µg/kg). Para o nível de fortificação de 40 µg/kg, com excepção da matriz sumo límpido, são cumpridos os requisitos regulamentares ($R=70-105\%$ para concentrações > 20 µg/kg e ≤ 50 µg/kg)

Tabela VI.11: Estudos de recuperação em várias matrizes alimentares em condições de precisão intermédia.

Fortificação (µg/kg)	Recuperação (%), n=20, 3 dias			Recuperação (%), n=60, 3 dias			
	Sumos límpidos	Sumos turvos	Purés	Média	Máx.	Min.	DPR%
5	78	72	61	70	90	52	13
28	67	72	64	68	85	51	10

Os valores de recuperação obtidos em condições de precisão intermédia para todos os níveis de fortificação e para todas as matrizes variam entre 61 e 78%. O valor de

recuperação mais elevado foi obtido em sumo límpido fortificado com 5 µg/kg e o mais baixo em puré fortificado com 5 µg/kg.

As recuperações foram avaliadas em termos de matriz e de nível de fortificação. Para avaliar o efeito de matriz fixou-se o nível de fortificação e compararam-se as recuperações entre as 3 matrizes. Para avaliar o efeito do nível de fortificação fixou-se a matriz e avaliaram-se as recuperações para os diferentes níveis de fortificação.

Para o nível de fortificação de 5 µg/kg existem diferenças estatisticamente significativas entre as recuperações obtidas nas várias matrizes ($p < 0,01$), verificando-se que os purés apresentam recuperações significativamente inferiores às dos sumos límpidos e turvos.

Para o nível de 28 µg/kg existem diferenças estatisticamente significativas entre as recuperações obtidas nas diferentes matrizes, particularmente entre sumo turvo e puré, ($p < 0,01$) verificando-se que os purés apresentam recuperações significativamente inferiores às dos sumos turvos.

Comparando as recuperações entre os dois níveis de fortificação verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas para os dois níveis de fortificação nos purés e sumos turvos. Os sumos límpidos apresentam diferenças estatisticamente significativas para um nível de significância de 1% ($p < 0,01$), entre os dois níveis de fortificação.

Os valores de recuperação do método em condições de precisão intermédia para o nível de fortificação de 5 µg/kg variam entre 61% e 78% para todas as matrizes analisadas. Estes valores cumprem os requisitos do regulamento 401/2006 ($R=50-120\%$, para concentrações de patulina inferiores a 20 µg/kg).

Para teores de patulina situados entre 20 e 50 µg/kg o regulamento 401/2006 estabelece um intervalo de valores de recuperação de 70 a 105%. Para o nível de fortificação de 28 µg/kg os sumos turvos cumprem os requisitos do regulamento.

Os valores de recuperação obtidos para sumos (67-78%) e purés (61-64%) são de um modo geral inferiores aos referidos na literatura. Iha e colaboradores (152) obtiveram valores de DPR% inferiores a 7,7% e recuperações superiores ou iguais a 81%, para níveis de fortificação de 7, 39 e 215 µg/L em sumos. Funes e colaboradores (151) referem para um nível de contaminação de 10 µg/kg um DPR% de 5,2% e uma recuperação de 75% em purés. Por sua vez Spadaro e colaboradores (74) apresentam valores de DPR% que variam entre 4,7 e 7,7% e uma recuperação de 91,9% para um nível de fortificação de 30 µg/kg.

7. Limites de determinação do método global

O valor do limite de determinação (LD) foi calculado com base nos valores médios de recuperação obtidos para o nível de fortificação de 5 µg/kg, nas diferentes matrizes analisadas.

A tabela VI.12 apresenta os limites de determinação para os sumos límpidos, turvos e purés de maçã.

Tabela VI.12: Limite de determinação do método de SPE-HPLC-UV para a análise de patulina em sumo límpido, sumo turvo e puré.

	Sumo límpido	Sumo turvo	Puré	Média
LD (µg/kg)	4,1	4,4	5,2	4,6

O limite de determinação do método de SPE-HPLC-UV é de 4,6 µg/kg. Este limite só deverá ser aplicado, quando as concentrações das amostras forem corrigidas em relação aos respectivos valores de recuperação.

8. Exactidão

A exactidão do método de análise da patulina foi avaliada com base nos resultados da participação em ensaios interlaboratoriais e com base na análise de materiais de referência. A figura VI.9 apresenta os resultados da participação em ensaios interlaboratoriais obtidos entre 2007 e 2009, incluindo os respectivos “z-scores”.

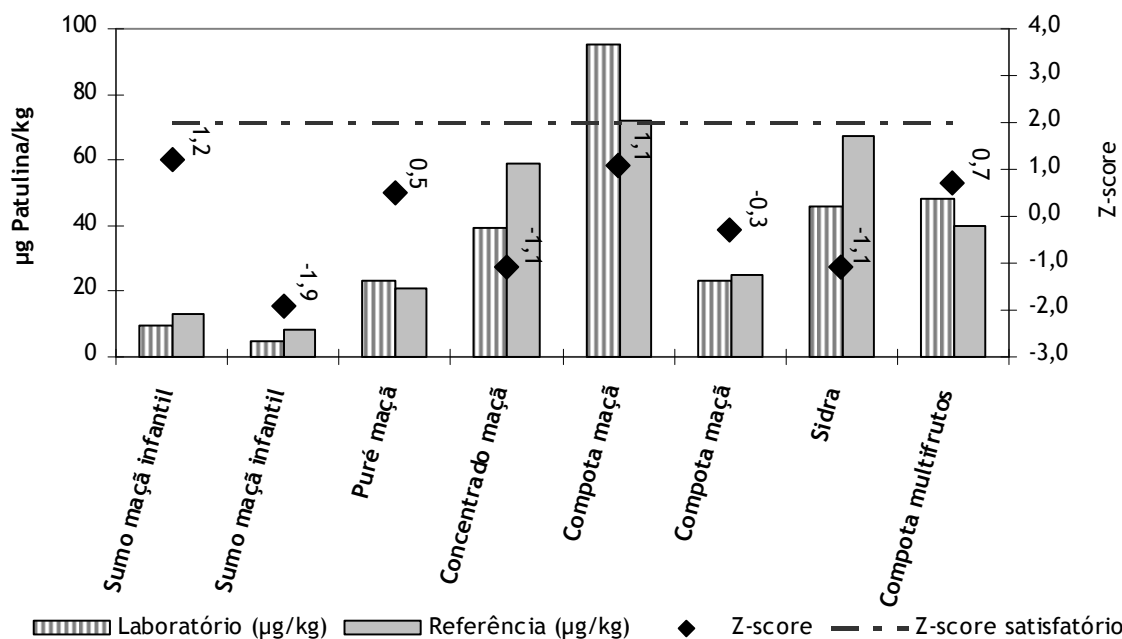


Figura VI.9: Resultados da participação em ensaios interlaboratoriais entre 2007 e 2009.

Como o intervalo de valores de “z-score” considerado satisfatório é de -2 a 2 (167) todos os ensaios efectuados são satisfatórios.

Na figura VI.10 apresentam-se os resultados da análise de materiais de referência FAPAS. Os resultados apresentados não foram corrigidos em relação ao valor da recuperação.

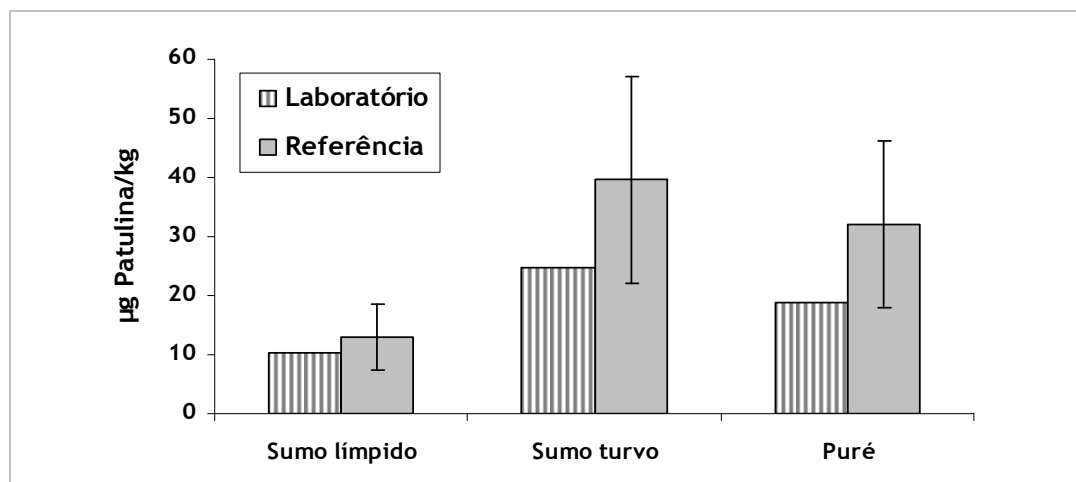


Figura VI.10: Resultados da análise de materiais de referência FAPAS (n=3).

O erro (percentual) para cada matrix foi de 21%, 38% e 41% para o sumo límpido, sumo turvo e puré, respectivamente. Considerando que o erro admissível para os materiais de referência analisados é de 44%, os valores obtidos situam-se abaixo do valor máximo permitido.

Se o erro for calculado depois de corrigir a concentração de cada material de referência com o valor de recuperação obtidos em condições de precisão intermédia (78%, 72% e 64% para sumo límpido, turvo e puré, respectivamente), o erro percentual desce para valores de -1,4%, 14% e 8,0% para sumo límpido, sumo turvo e puré, respectivamente.

A análise das três réplicas para cada matriz apresentou desvios padrão relativos de 7,3%, 1,7% e 1,5% para o sumo límpido, sumo turvo e puré, respectivamente.

Os resultados mostram que o método tem uma boa exactidão para os diferentes tipos de matriz, a qual foi comprovada pelos valores satisfatórios de “z-score” obtidos nos ensaios interlaboratoriais e pelos baixos valores do erro obtidos na análise de materiais de referência.

9. Controlo de qualidade interno

Ao longo das várias séries de trabalho, os valores dos parâmetros da curva de calibração (coeficiente de determinação, declive e ordenada na origem), das concentrações de patulina dos padrões de controlo de 8 e 25 µg/L, da recuperação e dos duplicados foram sendo introduzidos numa folha de cálculo com o objectivo de delinear as primeiras cartas de controlo de médias e amplitudes do método de SPE-HPLC-UV.

Cada carta tem delimitado um valor médio (média dos valores obtidos para o parâmetro em análise), o limite superior de controlo (LSC), o limite superior de aviso (LSA), o limite inferior de aviso (LIA), o limite inferior de controlo (LIC) e os valores individuais para cada parâmetro em análise. Estes acrónimos vão sendo ilustrados nas figuras VI.11, VI.12, VI.13 e VI.14.

A análise destas cartas e respectivos parâmetros de controlo permitiu delinear os primeiros valores de referência internos do controlo de qualidade da análise de patulina por SPE-HPLC-UV (critérios de aceitação internos).

9.1. Análise da curva de calibração e padrões de controle cromatográficos

A figura VI.11 apresenta as primeiras cartas controle dos parâmetros da curva de calibração da patulina por HPLC-UV.

Verifica-se que os valores do coeficiente de determinação (R^2) oscilam em torno de um valor médio de 0,9996 registrando um mínimo e um máximo de 0,9986 e de 1,0000, respectivamente. Comparando estes valores com o critério estabelecido para R^2 ($\geq 0,995$) verifica-se que todos cumprem o critério de aceitação.

O declive apresenta um valor médio de 1078,21 e um valor mínimo e máximo de 1026,23 e 1125,54 respectivamente.

A ordenada na origem oscila entre -1019,48 e 18866,08 apresentando um valor médio de 430,42.

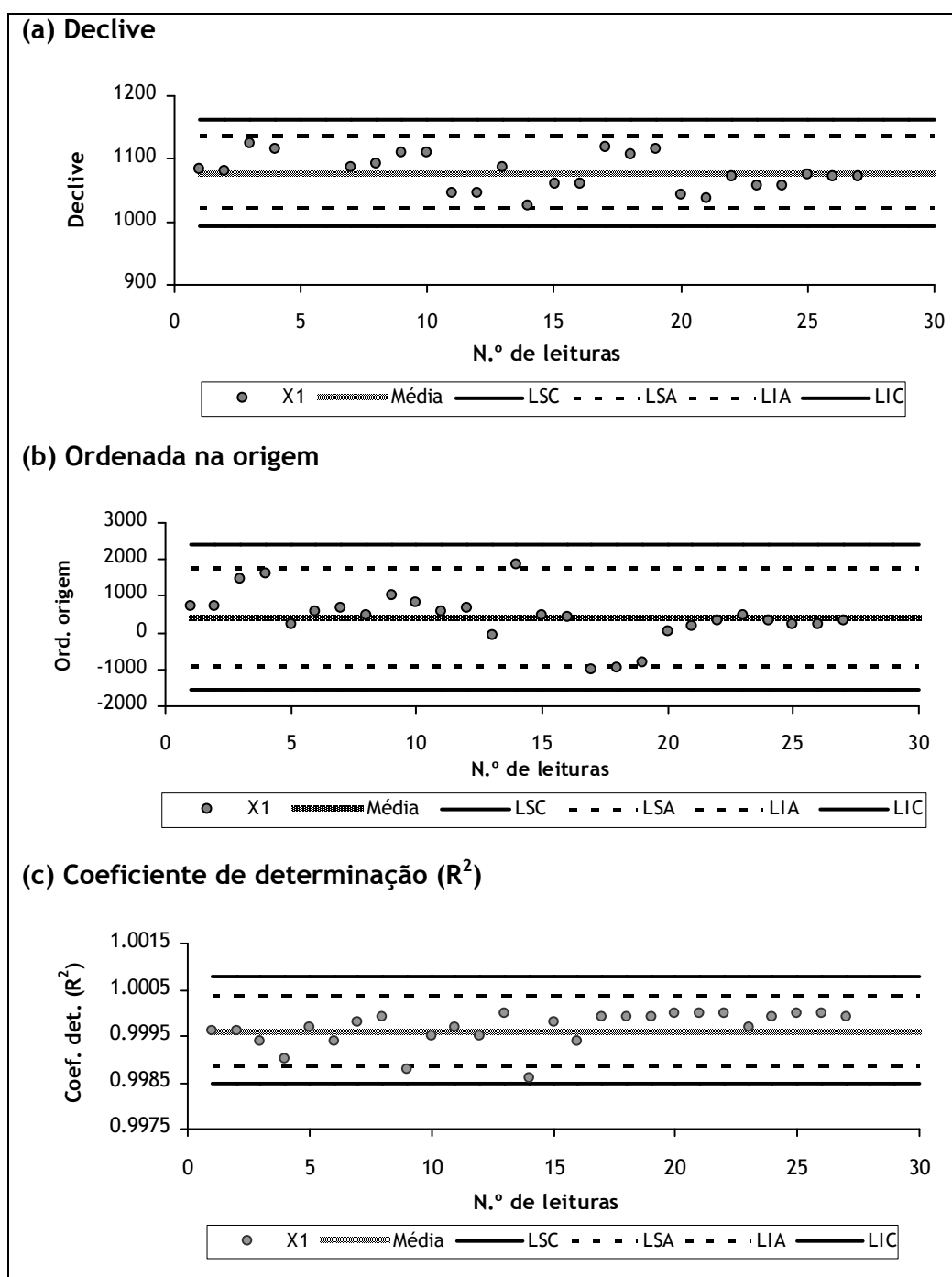


Figura VI.11: Cartas de controlo dos parâmetros da curva de calibração: coeficiente de determinação (a), declive (b) e ordenada na origem (c), $n \cong 27$.

A tabela VI.13 apresenta os valores das linhas de aviso (inferior e superior) e de controlo (inferior e superior), assim como o valor médio, das novas cartas de controlo para os parâmetros de controlo de qualidade da curva de calibração da patulina por HPLC-UV.

Tabela VI.13: Parâmetros das cartas de controlo referentes ao declive, ordenada na origem e coeficiente de determinação da patulina por HPLC-UV ($n=27$).

	Média	LIA	LSA	LIC	LSC
Declive	1078,21	1021,29	1135,12	992,828	1163,58
Ordenada na origem	430,42	-896,47	1757,30	-1559,9	2420,75
Coef. determinação (R^2)	0,9996	0,9989	1,0004	0,9985	1,0007

Ao longo de vinte e duas séries de trabalho analisaram-se dois padrões de controlo de HPLC, com concentrações de 8 e 25 $\mu\text{g/L}$ e construíram-se as respectivas cartas de controlo. A figura VI.12 apresenta a distribuição da concentração dos controlos nas respectivas cartas controlo e a tabela V.14 define os parâmetros de qualidade das respectivas cartas controlo.

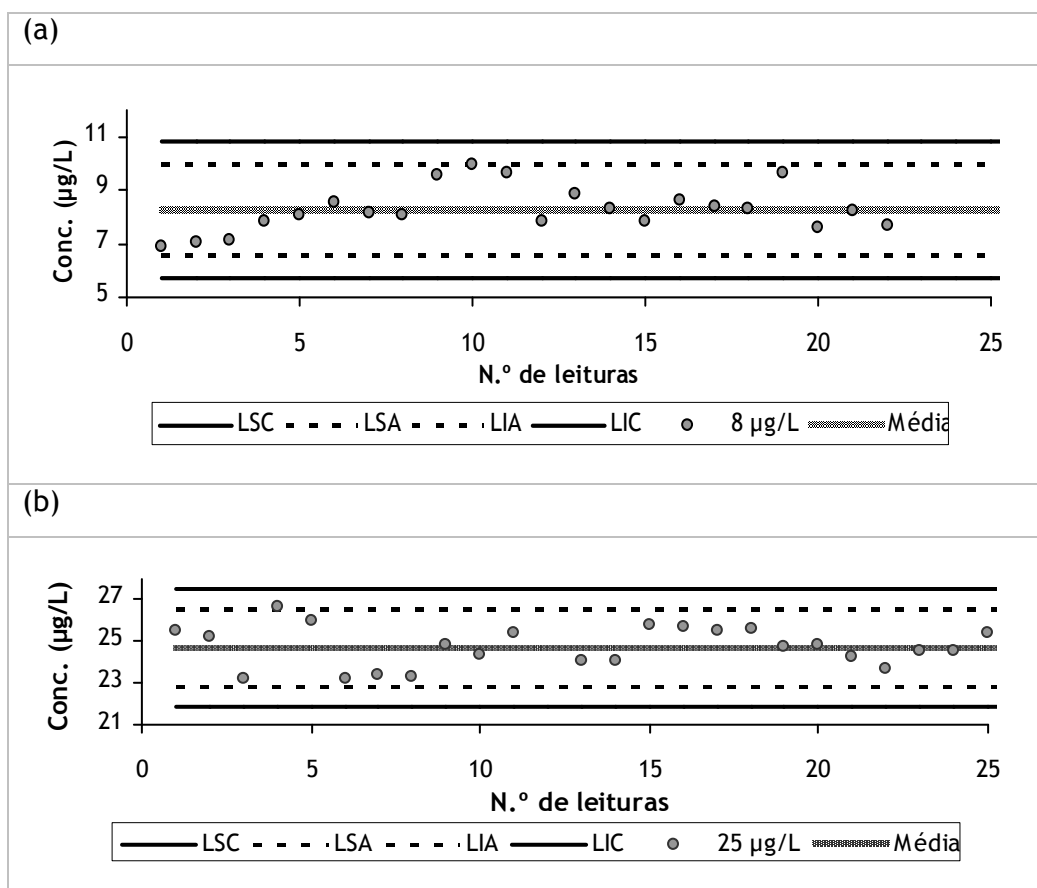


Figura VI.12: Cartas de controlo dos controlos do HPLC: 8 $\mu\text{g/L}$ (a) e 25 $\mu\text{g/L}$ (b), $n=22$.

Tabela VI.14: Parâmetros das cartas de controlo referentes aos controlos de 8 e 25 µg/L de patulina analisados por HPLC-UV (n=22).

Controlos	Média	LIA	LSA	LIC	LSC	DPR (%)
8 µg/L	8,3	6,6	10	5,7	11	10
25 µg/L	25	23	27	22	27	3,8

A concentração média de patulina no controlo de 8 µg/L é de 8,3 µg/L, apresentando valores que variam entre 6,9 e 10 µg/L e um desvio padrão de 10%. As concentrações de patulina no controlo de 25 µg/L oscilam entre 23 e 27 µg/L e apresentam um desvio padrão de 3,8%. Estes resultados mostram que existe uma variabilidade maior associada ao padrão de concentração mais baixa, comprovada por um valor mais elevado de DPR%, tal como seria de esperar.

9.2. Interferências de matriz

Para avaliar as interferências de matriz ao longo das várias séries de trabalho efectuaram-se ensaios de recuperação nos vários tipos de amostra (sumo limpido, sumo turvo e puré) fortificados com 28 µg/kg de patulina. O perfil da variação das recuperações está representado na carta de controlo da figura VI.13. A tabela VI.15 apresenta os valores das linhas de aviso e de controlo, assim como valor médio e respectivo desvio padrão relativo.

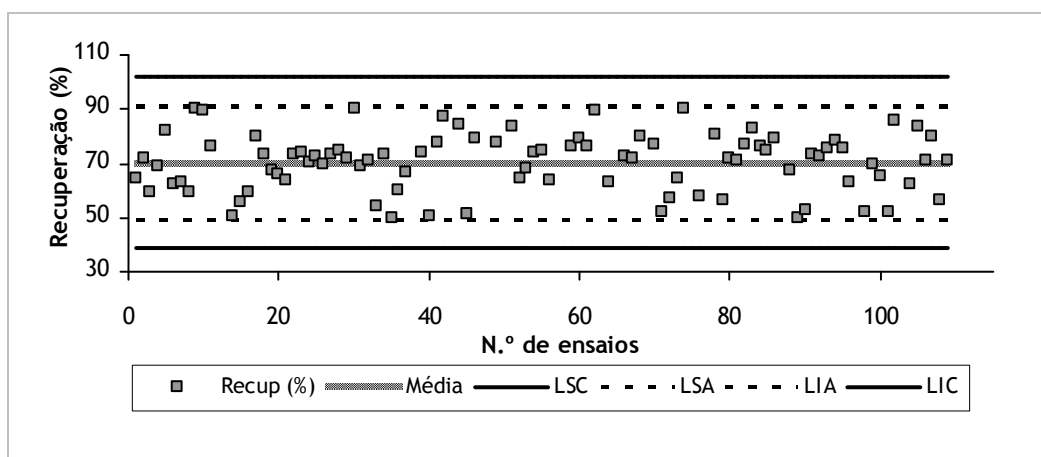


Figura VI.13: Cartas de controlo da recuperação, n=103.

Tabela VI.15: Parâmetros das cartas de controlo referentes à recuperação da patulina (R, %) em amostras de sumo límpido, sumo turvo e puré analisados por SPE-HPLC-UV (n=103).

Controlos	Média	LIA	LSA	LIC	LSC	DPR (%)
Recuperação (R, %)	70	49	91	39	102	15%

A recuperação média foi de 70%, com um valor mínimo de 50% e um máximo de 91%. De acordo com o Regulamento 401/2006, como as amostras foram fortificadas com 28 µg/kg de patulina, a recuperação deveria situar-se entre 70 e 105%. No entanto, obtiveram-se valores de recuperação inferiores a 70% em 7 amostras de sumo límpido, 8 de sumo turvo e 20 de purés. Estes resultados indicam que na maioria das análises os valores de recuperação cumprem os limites regulamentares, mas existem alguns problemas, em especial na matriz puré.

9.3. Avaliação da precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade através da análise de duplicados de amostras.

A figura VI.14 apresenta os valores das linhas de controlo (LSC e LSA), média e diferença de duplicados (DD %) das novas cartas de controlo para os duplicados de amostra.

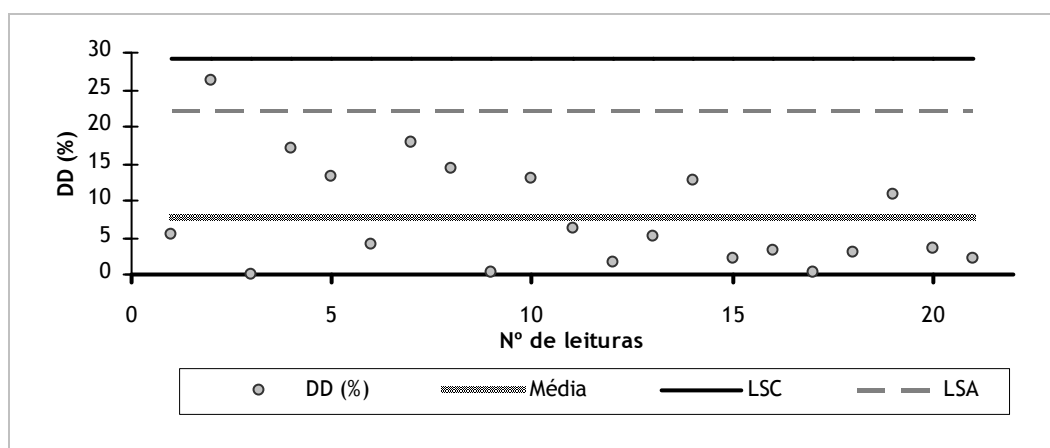


Figura VI.14: Carta de controlo de duplicados de amostras, n=21.

As amostras analisadas apresentam diferenças de duplicados muito variáveis consoante a sua gama de concentrações. Na gama baixa (3-6 µg/kg) os valores das diferenças de duplicados são mais elevados que para a gama alta (> 12 µg/kg). Na análise de duplicados de todas as amostras, o desvio padrão, embora baixo ($\pm 7\%$), é semelhante ao valor médio (7,7 µg/kg). Sendo assim as LIA e as LIC teriam valores negativos, os quais não são representativos da diferença de duplicados (%) cujos valores são sempre positivos. Sendo assim a carta de controlo apresenta apenas as linhas de controlo LSC e LSA.

A diferença dos duplicados foi calculada em 21 amostras com concentrações de patulina superiores ao LOQ (2,9 µg/kg). Os valores obtidos variaram entre 0,08% e 26%, com um valor médio de 8,3% e um DPR de 7,2%. O valor superior a 20% é único e corresponde a uma amostra de sumo turvo com uma concentração de patulina baixa, na ordem dos 5 µg/kg.

Os valores obtidos cumprem os requisitos do Regulamento 401/2006, o qual estabelece, em condições de repetibilidade, um DPR% de 30% ou inferior, para concentrações de patulina inferiores a 20 µg/kg e um DPR% de 20% ou inferior, para concentrações de patulina compreendidas entre 20 e 50 µg/kg.

Com base nos resultados obtidos estabeleceram-se os critérios de aceitação para a amplitude de duplicados (tabela VI.16).

Tabela VI.16: critérios de aceitação de duplicados

Teor de patulina	DD (%)
≤ 10 µg/kg	< 30%
10-20 µg/kg	< 20%
Entre 20 e 50 µg/kg	< 10%

9.4. Avaliação da exactidão

Nas análises de rotina, a exatidão foi avaliada através dos ensaios de recuperação (9.2. Interferência de matriz) ou através da análise de materiais de referência. A tabela VI.17 apresenta o erro (%) obtido para cada MRC analisado.

Tabela VI.17: Avaliação da exactidão: determinação do erro relativo (E_r) para vários materiais de referência.

Material	VL	VR	E_r
FAPAS T 1622, puré	30	32	6,3
FAPAS T 1622, puré	31	32	3,1
FAPAS T1626, sumo maçã (límpido)	12	13	7,7
FAPAS T1626, sumo maçã (límpido)	14	13	7,7
FAPAS T1621, sumo maçã para crianças (límpido)	8,3	8,4	1,2
Bipea 28-008-0328-0026 (puré maçã)	23	25	8,0

VL - Valor do laboratório, ou valor medido

VR - Valor de referência

Unidades: $\mu\text{g}/\text{kg}$ para purés e $\mu\text{g}/\text{L}$ para sumos.

O erro associado aos valores do laboratório (VL), corrigidos em relação à recuperação, oscila entre 1,2 % e 8,0 %, indicando que o método é exacto.

10. Análise de amostras

Depois de validado, o método de SPE-HPLC-UV foi aplicado à análise de 148 géneros alimentícios à base de maçã, incluindo 77 purés para alimentação infantil e 71 sumos de maçã, incluindo 10 destinados a lactentes e crianças jovens. No anexo 1 apresentam-se as características dos sumos e purés analisados, incluindo o teor em maçã e o tipo de matriz.

A figura VI.15 apresenta a título de exemplo, os cromatogramas de amostras de puré de maçã, sumo límpido e sumo turvo de maçã, naturalmente contaminadas com patulina.

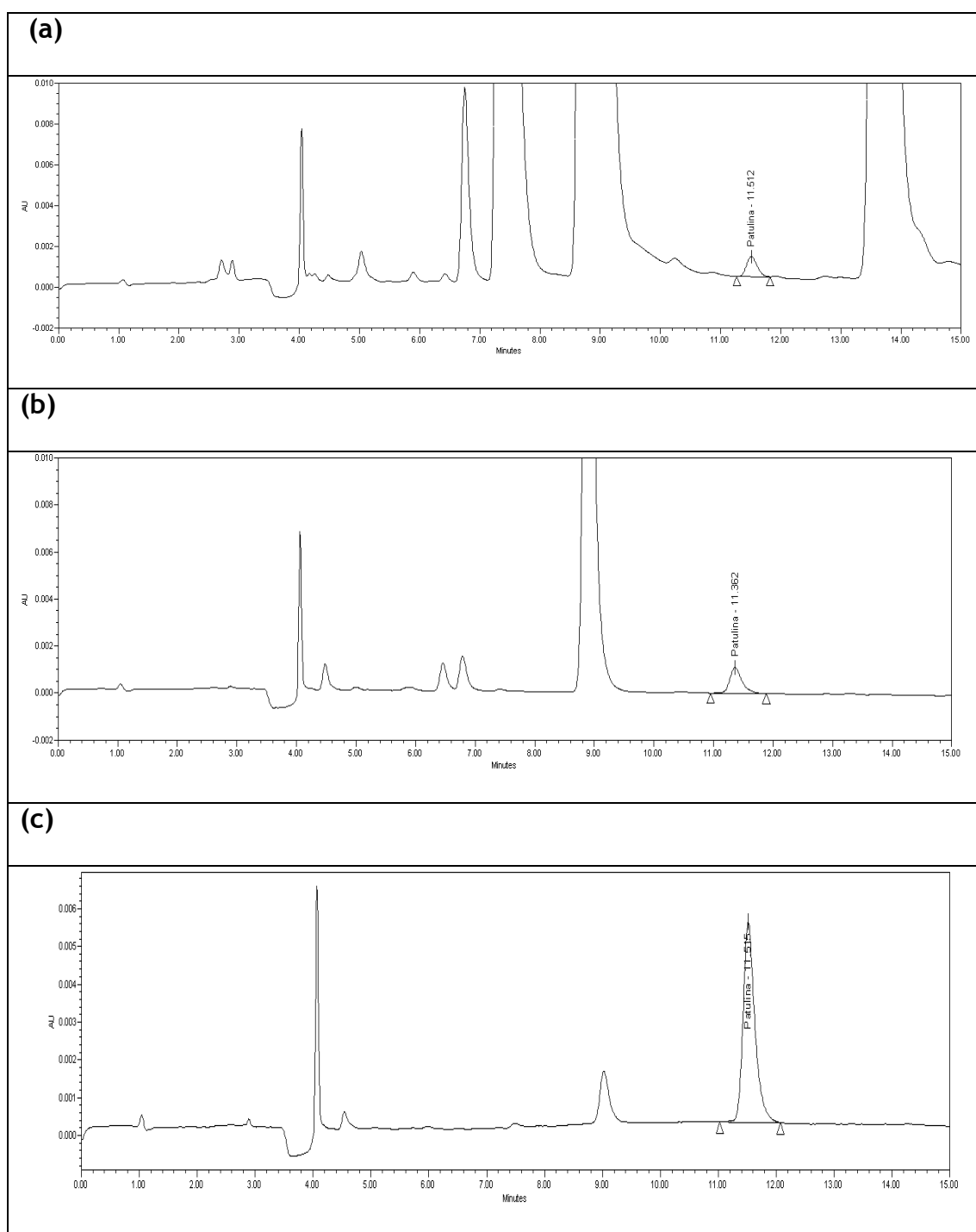


Figura VI.15 Cromatogramas de amostras naturalmente contaminadas com patulina. Puré (5,7 $\mu\text{g/kg}$) (a), sumo límpido (5,5 $\mu\text{g/kg}$) (b) e sumo turvo (42 $\mu\text{g/kg}$) (c).

Neste estudo, todas as amostras com níveis de contaminação superiores ao LOD (0,9 $\mu\text{g/kg}$) foram consideradas positivas. Para calcular a concentração média de patulina na

totalidade das amostras, atribuiu-se às amostras negativas, um valor de concentração correspondente a LOD/2 (60).

A tabela VI.18 apresenta os teores de patulina nas 148 amostras analisadas. Os resultados de concentração não foram corrigidos em relação à recuperação.

Tabela VI.18 Concentração de patulina em sumos e purés à base de maçã comercializados em Portugal.

Produto	Positivas/ Total	Positivas (%)	LOD - LOQ	LOQ - 10	10 - 50	Média ± DP (µg/kg)	Max. (µg/kg)
Sumos maçã	31/71	44	12	9	10	4,6 ± 8,6	42
Límpidos	4/31	13	2	2	0	0,98 ± 1,2	5,5
Turvos	27/40	67	10	7	10	7,4 ± 11	42
Purés	7/77	9	5	2	0	0,78 ± 0,80	5,7
Convencional	28/114	25	9	9	10	3,0 ± 7,0	42
Biológico	10/34	29	8	2	0	1,2 ± 1,6	9,2
Total	38/148	26	17	11	10	2,6 ± 6,3	42

LOD - Limite de detecção LOQ - limite de quantificação

DP - desvio padrão

Max - Máximo

As 148 amostras incluem um total de 87 amostras para alimentação infantil (10 sumos límpidos e 77 purés), 61 amostras de sumo (40 turvos e 21 límpidos) e correspondem a 34 amostras de origem biológica e a 114 convencionais, de acordo com as indicações do rótulo.

A patulina foi detectada em 38 amostras (26%) e quantificada em 21 (14%), apresentando uma contaminação média de $2,60 \pm 6,3$ µg/kg e um valor máximo de 42 µg/kg. Dezassete amostras apresentam níveis de contaminação entre o limite de detecção e o limite de quantificação (LOD - LOQ), 11 entre o LOQ e 10 µg/kg e 10 entre 10 e 50 µg/kg.

O valor de 10 µg/kg e de 50 µg/kg representam os valores máximos permitidos em produtos à base de maçã destinados à alimentação infantil e nos produtos à base de maçã em geral, respectivamente.

Comparando os diferentes tipos de matriz verifica-se que a incidência de amostras positivas é mais elevada em sumos turvos (67%) do que em sumos límpidos (13%) e purés (9%). O valor médio de contaminação é de $7,4 \pm 11 \mu\text{g/kg}$, $0,98 \pm 1,2 \mu\text{g/kg}$ e $0,78 \pm 0,80 \mu\text{g/kg}$ para sumos turvos, límpidos e purés, respectivamente.

O valor mais alto de contaminação encontrado foi de $42 \mu\text{g/kg}$ numa amostra de sumo turvo. A análise estatística (ANOVA) indica que a concentração de patulina em sumos turvos é significativamente mais elevada que a de sumos límpidos e purés ($p < 0,01$) e que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de patulina em sumos límpidos e purés.

Das 87 amostras para alimentação infantil, 10 sumos límpidos apresentam níveis de contaminação inferiores ao LOD e 7 dos 77 purés apresentam teores de patulina superiores ao LOD. Em 5 das 7 amostras positivas de puré detectaram-se níveis de contaminação entre o LOD e o LOQ e nas restantes 2 a concentração de patulina não ultrapassou os $5,7 \mu\text{g/kg}$.

De um total de 71 amostras de sumo analisadas foi detectada patulina em 27 sumos turvos e em 4 sumos límpidos, o que corresponde a uma incidência de amostras positivas de 44%.

Em 17 das 27 amostras positivas de sumo turvo a concentração de patulina é superior ao LOQ. Estas 17 amostras incluem 10 que apresentam teores de patulina superiores a $10 \mu\text{g/kg}$ e inferiores $50 \mu\text{g/kg}$. Em sumos límpidos apenas 2 das 4 amostras positivas apresentam concentrações acima do LOQ, registando um valor máximo de $5,5 \mu\text{g/kg}$.

Comparando o modo de produção (convencional e biológica) verifica-se que a incidência de amostras positivas em amostras de origem convencional é de 25% e em amostras de origem biológica é de 29%. A concentração média de patulina em amostras de origem convencional e biológica é de $3,0 \pm 7,0 \mu\text{g/kg}$ e de $1,2 \pm 1,6 \mu\text{g/kg}$, respectivamente. Os valores máximos de contaminação registados neste estudo foram de $42 \mu\text{g/kg}$ para produtos de origem convencional e de $9,2 \mu\text{g/kg}$ para produtos de origem biológica.

Estes resultados mostram que a incidência de amostras positivas é idêntica para as amostras convencionais e orgânicas, mas a concentração de patulina nos produtos convencionais é superior à encontrada nos produtos biológicos.

Os níveis de patulina detectados nas amostras encontram-se claramente abaixo dos valores regulamentados para alimentos à base de maçã destinados a lactentes e crianças jovens ($10 \mu\text{g/kg}$) e para sumos de fruta ($50 \mu\text{g/kg}$).

Os sumos turvos apresentam uma concentração média de patulina ($7,4 \mu\text{g/kg}$) superior à dos sumos límpidos ($0,98 \mu\text{g/kg}$) o que está de acordo com os resultados publicados por

outros autores. Baert e colaboradores (60) determinaram concentrações de patulina de 6,7 µg/L e 4,5 µg/L e Tangni e colaboradores (57) encontraram níveis de contaminação de 10,7 µg/L e 7,8 µg/L em sumos turvos e límpidos, respectivamente. No entanto Spadaro e colaboradores (74) registaram a presença de níveis mais elevados de patulina em sumos límpidos (10,81 µg/kg) do que em sumos turvos (7,59 µg/kg). Ritieni e colaboradores (77) referem ainda que não encontram diferenças relevantes entre a concentração de patulina em sumos turvos e límpidos.

Os resultados obtidos para sumos e os purés à base de maçã destinados à alimentação infantil mostram que os níveis de contaminação são bastante reduzidos (7 purés positivos com um máximo de 5,7 µg/kg) mas que apesar de tudo são mais elevados que os resultados publicados por alguns autores. Num estudo realizado pela “Food Standard Agency” em 2003-2004 (FSIS 68/04) (14) não se detectou patulina em nenhuma das 30 amostras de alimentos infantis analisadas. Num outro estudo realizado na Tunísia (72) com 21 purés de fruta para alimentação infantil não foi detectada patulina em nenhuma das amostras analisadas. Piemontese e colaboradores (76) registaram uma incidência de amostras positivas de 3/23 em puré de fruta para alimentação infantil e em Espanha não se detectou patulina em nenhuma das 12 amostras de alimentos para criança à base de maçã analisados (174). Beretta e colaboradores (61) analisaram 23 purés para alimentação infantil e os resultados mostraram que todas as amostras apresentam concentrações de patulina inferiores a 50 µg/kg e um valor máximo de contaminação de 6,39 µg/kg.

Capítulo VII - Conclusões

A patulina é uma micotoxina produzida por certas espécies de fungos que, com frequência, contaminam maçãs e produtos derivados, particularmente sumo e puré de maçã, alimentos amplamente consumidos por crianças. Os estudos de toxicidade mostram que esta micotoxina é genotóxica, mutagénica, imunossupressora e neurotóxica.

Face ao exposto considerou-se importante estudar a ocorrência de patulina em alimentos comercializados em Portugal, em especial, os destinados à alimentação infantil. Com este objectivo, optimizou-se e validou-se um método de SPE-HPLC-UV, o qual foi posteriormente utilizado na análise de sumos e purés à base de maçã.

Com base nos resultados dos estudos de optimização e validação conclui-se que:

As melhores condições de evaporação da patulina são obtidas a uma temperatura de 40°C, a uma pressão de 15 psi, durante 20 minutos.

O método cromatográfico (HPLC-UV) é linear, apresentando um bom coeficiente de determinação (0,9986), excelente coeficiente de variação do método ($CV_m = 3,0\%$) e uma gama de trabalho bem ajustada entre 8 e 100 µg/kg [$VT \leq F(n-1, n-1, 99\%)$], com limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), calculados com base em estudos de repetibilidade, de 0,84 µg/kg e 2,8 µg/kg, respectivamente.

O método HPLC-UV apresenta uma boa precisão. Em condições de repetibilidade apresenta um coeficiente de variação de 3,7%, 3,8 e 2,2% nas concentrações estudadas de 8 µg/L, 25 µg/L e 100 µg/L, respectivamente. Em condições de precisão intermédia apresenta um coeficiente de variação de 4,7%, 6,5 e 4,0% nas concentrações estudadas de 8 µg/L, 25 µg/L e 100 µg/L, respectivamente.

O método SPE-HPLC-UV apresenta limites de detecção e de quantificação de 0,90 µg/kg e 2,9 µg/kg, respectivamente.

O método de SPE-HPLC-UV optimizado e validado para a análise de patulina em sumos e purés de maçã permite a análise de rotina desta micotoxina neste tipo de género alimentício.

O método SPE-HPLC-UV apresenta uma boa precisão. Em condições de repetibilidade apresenta um coeficiente de variação de 7,9%, 10% e 8,3% nas concentrações estudadas de 5 µg/kg, 28 µg/kg e 100 µg/kg, respectivamente. Em condições de precisão intermédia apresenta um coeficiente de variação de 7,2% e 8,3% nas concentrações estudadas de 5 µg/kg e 28 µg/kg, respectivamente.

O método é exacto apresentando valores de “z-score” compreendidos -1,9 e 1,2, obtidos nos ensaios interlaboratoriais e erros $\leq 14\%$ calculados com base na análise dos materiais de referência.

A recuperação nas várias matrizes variou entre 61% e 78%, em condições de precisão intermédia, para os níveis de 5 $\mu\text{g/kg}$ e 28 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente.

O limite de determinação para o método global SPE-HPLC-UV, calculado com base no valor médio de recuperação obtido nas várias matrizes estudadas varia entre 4,1 $\mu\text{g/kg}$ e 5,2 $\mu\text{g/kg}$, com um valor médio de 4,6 $\mu\text{g/kg}$.

No que diz respeito à aplicabilidade deste método analítico em ensaios de rotina, o método optimizado e validado é simples e rápido, com tempos de extracção/concentração de amostra (10 mL) de aproximadamente uma hora e com uma corrida cromatográfica de quinze minutos.

Do ponto de vista ambiental, o método não requer grandes quantidades de solventes orgânicos, no entanto, devem ser seguidas as boas práticas e cumpridos os requisitos legais aplicáveis, com vista à adequada eliminação dos resíduos resultantes.

Desta forma, podemos afirmar que o método de SPE-HPLC-UV pode ser implementado como método de rotina no controlo da qualidade dos sumos e purés à base de maçã, no que se refere à patulina.

No decorrer do trabalho foram criadas as ferramentas necessárias para a implementação de um processo de validação, aplicável à determinação da patulina e de outros analitos, nomeadamente, a elaboração do procedimento de ensaio para análise de patulina (anexo 9), a criação de sistemas de registo e de tratamento dos resultados (anexos 10 a 18), a elaboração dos procedimentos de validação, a elaboração de cartas de controlo e a definição de critérios de aceitação (controlo de qualidade interno). Deste modo, o processo inerente à validação do método de ensaio, assim com os resultados obtidos, permitirão preparar o processo de acreditação do método.

Em Portugal, este é o primeiro estudo de ocorrência de patulina em alimentação infantil, sendo também aquele em que se analisou maior número de amostras de produtos alimentares à base de maçã, incluindo produtos de origem biológica e convencional.

Com base nos resultados de ocorrência de patulina nos produtos analisados concluiu-se que:

Nas 148 amostras analisadas a patulina foi detectada em 38 amostras (26%) e quantificada em 21 (14%), apresentando uma contaminação média de $2,60 \pm 6,3 \mu\text{g/kg}$ e um valor máximo de contaminação de $42 \mu\text{g/kg}$.

A incidência de amostras positivas foi mais elevada em sumos turvos (67%) comparativamente como os sumos límpidos (13%) e purés (9%) e o valor médio de contaminação foi de $7,4 \pm 10,7 \mu\text{g/kg}$, $0,98 \pm 1,23 \mu\text{g/kg}$ e $0,78 \pm 0,80 \mu\text{g/kg}$ para sumos turvos, límpidos e purés, respectivamente.

Nas 87 amostras para alimentação infantil, os 10 sumos límpidos analisados apresentaram níveis de contaminação inferiores ao LOD e 7 dos 77 purés apresentaram teores de patulina superiores ao LOD, como um máximo de $5,7 \mu\text{g/kg}$.

A incidência de amostras positivas é idêntica para as amostras convencionais e biológicas.

Os resultados deste estudo mostram que os produtos destinados a lactentes e crianças jovens apresentam níveis reduzidos de contaminação com patulina ($< 10 \mu\text{g/kg}$) e que os níveis de patulina encontrados em sumos, em particular nos sumos turvos, são superiores aos encontrados nos produtos para alimentação infantil, embora sempre inferiores aos legislados ($< 50 \mu\text{g/kg}$). Considerando que os níveis de patulina presentes em alimentos à base de maçã constituem um bom indicador da qualidade da fruta utilizada no seu fabrico, os resultados indicam que, de um modo geral, as maçãs utilizadas no fabrico dos alimentos destinados às crianças são de qualidade aceitável.

No entanto, o facto da incidência das amostras positivas ser superior nos sumos turvos, sugere a necessidade da indústria alimentar de produção de sumos de maçã, desenvolver e implementar um sistema de controlo de qualidade, com o objectivo de evitar ou minimizar a presença de patulina em sumos de maçã e noutros produtos alimentares derivados de maçã, nomeadamente através da selecção de fruta de qualidade adequada.

Considera-se importante aumentar o número e tipo de sumos analisados com vista a obter uma visão mais completa sobre a incidência desta micotoxina em sumos, particularmente sumos turvos, consumidos em Portugal.

Estes dados contribuirão juntamente com a obtenção de dados de consumo das diferentes faixas etárias para uma real avaliação da exposição da população portuguesa a esta micotoxina.

Num futuro próximo pretende-se implementar o método de cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa “tandem” (LC-MS/MS) com o objectivo de poder confirmar as amostras positivas e, eventualmente, para usar em rotina.

Bibliografia e referências bibliográficas

1. International Agency for Research on Cancer IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*. Zearalenone, deoxynivalenol and fusarenone X (group 3). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Summary of data reported and evaluation, volume 56. Lyon: IARC; 1993.
2. Pittet A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: A decade in review, Chapter 6. Hazekamp 2, 6707 HG Wageningen (The Netherlands): W.J. de Koe; 2001.
3. Baert K, De Meulenaer B, Kasase C, Huyghebaert A, Ooghe W, Devlieghere F. Free and bound patulin in cloudy apple juice. *Food Chem* 2007;100(3):1278-82.
4. Baert K, De Meulenaer B, Verdonck F, Huybrechts I, De Henauw S, Vanrolleghem P, et al. Variability and uncertainty assessment of patulin exposure for preschool children in Flanders. *Food Chem Toxicol* 2007 SEP;45(9):1745-51.
5. Gokmen V, Acar J. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. *J Chromatogr A* 1998 JUL 31;815(1):99-102.
6. Leggott N, Shephard G. Patulin in South African commercial apple products. *Food Control* 2001 MAR;12(2):73-6.
7. International Agency for Research on Cancer IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation, volume 40. Lyon 1986 [27-02-09]; Available from: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol40/patulin.html>.
8. Baert K, Kamala A, De Meulenaer B, Huybrechts I, De Henauw S, Devlieghere F. Exposure assessment of patulin in apple juice for Flemish young children. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Applications of Modelling as an Innovative Technology in the Agri-Food Chain* 2005(674):389-90.
9. Jornal Oficial da União Europeia. Regulamento (CE) 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes em géneros alimentícios, L364/5-24 (2006).

10. Turner N, Subrahmanyam S, Piletsky S. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal Chim Acta* 2009 JAN 26;632(2):168-80.
11. Shephard G. Determination of mycotoxins in human foods. *Chem Soc Rev* 2008;37(11):2468-77.
12. Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, Macdonald S, Crews C. Mycotoxin analysis: An update. *Food Addit Contam* 2008;25(2):152-63.
13. Bennett J, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 2003 JUL;16(3):497-+.
14. FSIS (Food Survey Information Sheets): Survey of baby foods for mycotoxins, FSIS 68/04. 2004 [20-01-09]; Available from: <http://www.food.gov.uk/science/surveillance>.
15. Shephard G. Mycotoxins in the contexts of food risks and nutrition issues. The mycotoxin factbook, 21-32. Barug D, Bhatnagar D, van Egmond HP, Van der Kamp JW, Van Ossenbruggen WA, Visconti A, editors. Wageningen: Wageningen Academic; 2006.
16. JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirthy-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives. Technical report and corrigenda. Report Series N° 789, 22-25. 1990 [20-11-2008]; Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_789.pdf.
17. World Health Organization WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants (Forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 859, 36-38. Geneva 1995 [02-10-08]; Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_859.pdf.
18. Klaassen C, Watkins III J. Toxicologia: A Ciência básica dos tóxicos de Casarett & Doull's. 5ª ed. Klaassen C, Watkins III J, editors. Lisboa: McGraw Hill, Portugal; 2001.
19. FDA (United States Food and Drug Administration): Patulin in apple juice, apple juice concentrates and apple juice products. 2000 [29-10-08]; Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/patubck2.html>.
20. FDA (United States Food and Drug Administration): Compliance policy guide Sec. 510.150 Apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products - adulteration with patulin. 2001 [29-06-09]; Available from: <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074427.htm>.

21. Henry CJ. Risk assessment, risk evaluation, and risk management. Food Safety & Toxicity. DeVries J, editor. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1997.
22. World Health Organization WHO. The world health report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life. [02-06-09]; Available from: <http://www.who.int/whr/2002/en/>.
23. Etzel R. What the primary care pediatrician should know about syndromes associated with exposures to mycotoxins. Current problems in pediatric and adolescent health care 2006;36:282-305.
24. Zinedine A, Manes J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. Food Control 2009 APR;20(4):334-44.
25. Nelson B. Stachybotrys chartarum: the toxic indoor mold. 2001 [10-10-08]; Available from: <http://www.apsnet.org/online/feature/Stachybotrys/>.
26. Saxena N, Ansari K, Kumar R, Dhawan A, Dwivedi P, Das M. Patulin causes DNA damage leading to cell cycle arrest and apoptosis through modulation of Bax, p(53) and p(21/WAF1) proteins in skin of mice. Toxicol Appl Pharmacol 2009 JAN 15;234(2):192-201.
27. Speijers G, Speijers M. Combined toxic effects of mycotoxins. Toxicol Lett 2004 OCT 10;153(1):91-8.
28. Creppy E, Chiarappa P, Baudrimont P, Moukha S, Carratu M. Synergistic effects of fumonisin B-1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? Toxicology 2004 SEP 1;201(1-3):115-23.
29. Alvito P. Micotoxinas, uma visão global. Módulo de Toxicologia e Saúde do mestrado em Biologia Humana e Ambiente da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge; 2008.
30. Centers for Disease Control and Prevention CDC. Outbreak of Aflatoxin Poisoning Eastern and Central Provinces, Kenya. Morbidity and Mortality weekly report 2004.
31. International Agency for Research on Cancer IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphtalene and styrene, volume 82. Lyon 2002 [27-02-09]; Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82.pdf>.

32. Verstraete F. Decision-making process and overview of recent and future European Union legislation on mycotoxins in food and feed. Barug D, Bhatnagar D, van Egmond H, Van der Kamp J, Van Ossenbruggen W, Visconti A, editors. Wageningen: Wageningen Academic; 2006.
33. Wu F. Economic impact of fumonisins and aflatoxin regulations on global corn and peanut markets. The mycotoxin factbook, 83-91. Wageningen: Wageningen Academic; 2006.
34. Zollner P, Mayer-Helm B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. J Chromatogr A 2006 DEC 15;1136(2):123-69.
35. Lino C, Silva L, Pena A. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias 2004;99(552):181-92.
36. JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives and contaminants, Summary of JECFA Evaluation, Fumonisin. 2002 [02-06-09]; Available from: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_870.htm.
37. Krska R, Welzig E. Mycotoxin Analysis: an overview of classical, rapid and emerging techniques. The mycotoxin factbook, 225-241. Barug D, Bhatnagar D, van Egmond HP, Van der Kamp JW, Van Ossenbruggen WA, Visconti A, editors. Wageningen: Wageningen Academic; 2006.
38. Murphy P, Hendrich S, Landgren C, Bryant C. Food mycotoxins: An update. J Food Sci 2006 JUN-JUL;71(5):R51-R65.
39. JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives. Summary of JECFA Evaluation, OTA. 2002 [02-06-09]; Available from: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_1746.htm.
40. European Food Safety Authority EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food (Question n° EFSA-Q-2005-154)2006.
41. European Commission: Opinion of the Scientific Committee on food on Fusarium-toxins Part 1: Deoxynivalenol (DON). 1999 [02-06-09]; Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf.
42. European Commission: Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium-toxins Part 2: zearalenone (ZEA). 2000 [02-06-09]; Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf.

43. Jestoi M. Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin - A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008 JAN;48(1):21-49.
44. van der Fels-Klerx H, Kandhai M, Brynestad S, Dreyer M, Börjesson T, Martins H, et al. Development of a European system for identification of emerging mycotoxins in wheat supply chains. *World Mycotoxin Journal* 2009;2(2):119-27.
45. Park M, Bos P. Information sources for the detection of emerging mycotoxin risks, RIVM report 320111001. Bilthoven: RIVM (National Institute for Public Health and the Environment) 2007.
46. Piva G, Battilani P, Pietri A. Emerging issues in southern Europe: Aflatoxins in Italy. *The mycotoxin factbook*, 139-151. Barug D, Bhatnagar D, van Egmond H, Van der Kamp J, Van Ossenbruggen W, Visconti A, editors. Wageningen: Wageningen Academic; 2006.
47. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. Climate change: implications for food safety, Rome, Italy 2004.
48. Katzman P, Hays E, Cain C, Van Wyk J, Reithel F, Thayer S, et al. Clavacin, an antibiotic substance from *aspergillus clavatus*. *J Biol Chem* 1944 JUL;154(2):475-86.
49. Pádua R, Junior M. Aspectos toxicológicos e ocorrência de patulina em suco de maçã. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina 2005;26(4):535-42.
50. Iwahashi Y, Hosoda H, Park J, Lee J, Suzuki Y, Kitagawa E, et al. Mechanisms of patulin toxicity under conditions that inhibit yeast growth. *J Agric Food Chem* 2006 MAR 8;54(5):1936-42.
51. Hopmans EC. Patulin: a mycotoxin in apples, *Perishables Handling Quarterly*, 91:5-6. 1997 [20-01-09]; Available from: <http://postharvest.ucdavis.edu/datastorefiles/234-166.pdf>.
52. Sabater-Vilar M, Maas R, De Bosschere H, Ducatelle R, Fink-Gremmels J. Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle. *Mycophatologia* 2004 NOV;158(4):419-26.
53. Moake M, Padilla-Zakour O, Worobo R. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2005 JAN;4(1):8-21.
54. Gonzalez-Osnaya L, Soriano J, Molto J, Manes J. Exposure to patulin from consumption of apple-based products. *Food Addit Contam* 2007;24(11):1268-74.

55. Majerus & Kapp, Assessment of dietary intake of patulin by the population of the EU member states. Report on tasks for scientific cooperation (SCOOP), Task 3.2.8 Directorate - General Health and Consumer Protection 2002.
56. MacDonald S, Long M, Gilbert J, Felgueiras I. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study. *JAOAC Int* 2000 NOV-DEC;83(6):1387-94.
57. Tangni E, Theys R, Mignolet E, Maudoux M, Michelet J, Larondelle Y. Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Addit Contam* 2003 MAY;20(5):482-9.
58. Frisvad J, Smedsgaard J, Larsen T, Samson R. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud Mycol* 2004(49):201-41.
59. Tournas V. Hat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. *Crit Rev Microbiol* 1994;20(4):243-63.
60. Baert K, De Meulenaer B, Kamala A, Kasase C, Devlieghere F. Occurrence of patulin in organic, conventional, and handcrafted apple juices marketed in Belgium. *J Food Prot* 2006 JUN;69(6):1371-8.
61. Beretta B, Gaiaschi A, Galli C, Restani P. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Addit Contam* 2000 MAY;17(5):399-406.
62. Gokmen V, Acar J, Sarioglu K. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction. *Anal Chim Acta* 2005 JUL 6;543(1-2):64-9.
63. European Mycotoxin Awareness Network EMAN. [20-01-2009]; Available from: <http://www.mycotoxins.org/>.
64. Fermentek. Patulin by fermentek. [29-06-09]; Available from: <http://www.fermentek.co.il/patulin.htm>.
65. Ministry of Agriculture FaF, M A F F. Patulin in apple juice: 1993 survey, information sheet, 16. 1993 [02-06-08]; Available from: <http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1993/no16/16pat.htm>.
66. Martins M, Gimeno A, Martins H, Bernardo F. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food Addit Contam* 2002 JUN;19(6):568-74.

67. Novo R, Felgueiras I, editors. Apple and pear juices. Qualidade e Segurança Alimentar; 2002 22 Maio; Lisboa: ISA.
68. Boonzaaijer G, Bobeldijk I, van Osenbruggen W. Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method. Food Control 2005 SEP;16(7):587-91.
69. Cheraghali A, Mohammadi H, Amirahmadi M, Yazdanpanah H, Abouhossain G, Zamanian F, *et al.* Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. Food Control 2005 FEB;16(2):165-7.
70. Ito R, Yamazaki H, Inoue K, Yoshimura Y, Kawaguchi M, Nakazawa H. Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Japan. J Agric Food Chem 2004 DEC 15;52(25):7464-8.
71. Li F, Zhao S, Chin L, Li Y, Wu D, Zhao X, *et al.* Determination of patulin in apple and hawthorn beverages by solid-phase filtration column and liquid chromatography. JAOAC Int 2007 JAN-FEB;90(1):167-72.
72. Mhadhbi H, Bouzouita N, Martel A, Zarrouk H. Occurrence of mycotoxin patulin in apple-based products marketed in Tunisia. J Food Prot 2007 NOV;70(11):2642-5.
73. Murillo-Arbizu M, Amezcua S, Gonzalez-Penas E, de Cerain A. Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. Food Chem 2008 MAR 15;113(2):420-3.
74. Spadaro D, Ciavarella A, Frati S, Garibaldi A, Gullino M. Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. Food Control 2007 SEP;18(9):1098-102.
75. Iha M, Sabino M. Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks. Food Control 2008 APR;19(4):417-22.
76. Piemontese L, Solfrizzo M, Visconti A. Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. Food Addit Contam 2005 MAY 2005;22(5):437-42.
77. Riteni A. Patulin in Italian commercial apple products. J Agric Food Chem 2003 SEP 24;51(20):6086-90.
78. Veiga F. A Agricultura Biológica no Alentejo. [20-07-09]; Available from: http://www.draal.min-agricultura.pt/informacoes/artigos/Agricultura_biologicaAlentejo.pdf.

79. Regulamento (CE) N.º 834/2007 do Conselho de 28 de Junho de 2007 relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos e que revoga o Regulamento (CE) n.º 2092/91.
80. Firmino A. Organic Farming in Portugal. Available from: http://www.organic-europe.net/country_reports/portugal/default.asp.
81. Malmauret L, Parent-Massin D, Hardy J, Verger P. Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Addit Contam* 2002 JUN;19(6):524-32.
82. Broom W. The pharmacology of patulin. *Brit J of Exp Pathol* 1944;25:195-207.
83. Schumacher D, Metzler M, Lehmann L. Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Arch Toxicol* 2005 FEB;79(2).
84. Escoula L, More J, Baradat C. Toxins of *Byssoschlamys-nivea* westling.1. acute toxicity of patulin in adult rats and mice. *Ann Rech Vet* 1977;8(1):41-9.
85. International Agency for Research on Cancer IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Patulin (IARC Summary & Evaluation), volume 10. Lyon 1976 [27-02-09]; Available from: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol10/patulin.html>.
86. International Agency for Research on Cancer IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenicity to humans. Group 3: Not classifiable as to carcinogenicity to humans, Patulin [149-29-1], Vol. 40, Suppl. 7. 1987 [05-06-08]; Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/crthgr03.php>.
87. Fliege R, Metzler M. The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks in vitro involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and alpha-amino groups. *Chem Biol Interact* 1999 NOV 30;123(2):85-103.
88. Fliege R, Metzler M. Electrophilic properties of patulin. Adduct structures and reaction pathways with 4-bromothiophenol and other model nucleophiles. *Chem Res Toxicol* 2000 MAY;13(5):363-72.
89. Fliege R, Metzler M. Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts. *Chem Res Toxicol* 2000 MAY;13(5):373-81.
90. Mahfoud R, Maresca M, Garmy N, Fantini J. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: Mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002 JUN 15;181(3):209-18.

91. Wichmann G, Herbarth O, Lehmann I. The mycotoxins citrinin, gliotoxin and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environ Toxicol* [serial on the Internet]. 2002; 17(3).
92. Rychlik M, Kircher F, Schusdziarra V, Lippl F. Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach. *Food Chem Toxicol* 2004 MAY;42(5):729-35.
93. Liu B, Yu F, Wu T, Li S, Su M, Wang M, et al. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003 SEP 15;191(3):255-63.
94. Liu B, Wu T, Yu F, Wang C. Mycotoxin patulin activates the p38 kinase and JNK signaling pathways in human embryonic kidney cells. *Toxicol Sci* 2006 FEB;89(2):423-30.
95. Liu B, Wu T, Yu F, Su C. Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells. *Toxicol Sci* 2007 FEB;95(2):340-7.
96. Pfeiffer E, Gross K, Metzler M. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis* 1998 JUL;19(7):1313-8.
97. Alves I, Oliveira N, Laires A, Rodrigues A, Rueff J. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis* 2000 MAY;15(3):229-34.
98. Shephard G, Leggott N. Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *J Chromatogr A* 2000 JUN 16;882(1-2):17-22.
99. Arafat W, Musa M. Patulin-induced inhibition of protein-synthesis in hepatoma tissue-culture. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1995 FEB;87(2):177-86.
100. Osswald H, Frank H, Komitowski D, Winter H. Long-term testing of patulin administered orally to sprague-Dawley rats and swissmice. *Food Cosmet Toxicol* 1978;16(3):243-7.
101. Hopkins J. The toxicological hazards of patulin. *Food Chem Toxicol* 1993 JUN;31(6):455-6.
102. Selmanoglu G. Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats. *Food Chem Toxicol* 2006 DEC;44(12):2019-24.
103. Llewellyn G, McCay J, Brown R, Musgrove D, Butterworth L, Munson A, et al. Immunological evaluation of the mycotoxin patulin in female B6C3F(1) mice. *Food Chem Toxicol* 1998 DEC;36(12):1107-15.

104. World Health Organization WHO. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food:patulin. WHO Food Additives Series, No. 35, 377-402. 1996 [02-10-08]; Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je16.htm>.
105. Drusch S, Kopka S, Kaeding J. Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. Food Chem 2007;100(1):192-7.
106. van Egmond H. Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe. Anal Bioanal Chem 2004 MAR;378(5):1152-60.
107. Dias MB. Avaliação e comunicação dos riscos alimentares, ASAE. 2007.
108. Plunkett L, Turnbull D, Phil D, Rodricks J. Differences between adults and children affecting exposure assessment. P. S. Guzelian CJH, and S. S Olin, editor. Washington, DC: ILSI Press; 1992.
109. Jornal Oficial da União Europeia. Recomendação 2003/598/CE da Comissão, de 11 de Agosto de 2003 relativa à prevenção e redução da contaminação por patulina do sumo de maçã e dos ingredientes do sumo de maçã noutras bebidas, L203/0054-0059 (2003).
110. HAH H. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2000;16(7):607-12.
111. Venturini M, Blanco D, Oria R. In vitro antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. J Food Prot 2002;65(5):834-9.
112. Welke J, Hoeltz M, Dottori H, Noll I. Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. Food Control 2009 JAN;20(1):48-52.
113. Leggott N, Shephard G, Stockenstrom S, Staal E, van Schalkwyk D. The reduction of patulin in apple juice by three different types of activated carbon. Food Addit Contam2001 SEP;18(9):825-9.
114. Kadakal C, Nas S. Effect of activated charcoal on patulin, fumaric acid and some other properties of apple juice. Nahrung-Food 2002 FEB;46(1):31-3.
115. Bissessur J, Permaul K, Odhav B. Reduction of patulin during apple juice clarification. J Food Prot 2001 AUG;64(8):1216-9.
116. Moss M, Long M. Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Food Addit Contam 2002 Apr;19(4):387-99.
117. van Egmond H, Schothorst R, Jonker M. Regulations relating to mycotoxins in food. Anal Bioanal Chem 2007 SEP;389(1):147-57.

118. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. World wide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, Rome, Italy 2004.
119. Jornal Oficial da União Europeia. Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios, L70/12-34 (2006).
120. Shephard G. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Addit Contam* 2008;25(2):146-51.
121. Almeida CMM. Métodos analíticos para o controlo de qualidade, aulas de pós graduação, unidade de formação 2. Lisboa: Universidade Lusófona; 2008.
122. Moldoveanu S, David V. *Sample Preparation in Chromatography (Journal of Chromatography Library)*. 1st Edition ed: Elsevier Science; 2002.
123. Almeida CMM. Dissertação para obtenção do grau de Doutor, Especificação orgânica em águas para consumo humano: fenol, benzeno e compostos derivados. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2001.
124. SUPELCO. Bulletin 910, Guide to Solid Phase Extraction, Sigma-Aldrich Co, 1998.
125. Wu R, Dang Y, Niu L, Hu H. Application of matrix solid-phase dispersion-HPLC method to determine patulin in apple and apple juice concentrate. *J Food Compos Anal* 2008 NOV;21(7):582-6.
126. Trucksess M. AOAC Official Method 995.10, Patulin in apple juice. *Natural Toxins*, vol 49, 51-53. 2000.
127. Murillo M, Gonzalez-Penas E, Amezcua S. Determination of patulin in commercial apple juice by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chem Toxicol* 2008 JAN;46(1):57-64.
128. Murillo-Arbizu M, Gonzalez-Penas E, Hansen S, Amezcua S, Ostergaard J. Development and validation of a microemulsion electrokinetic chromatography method for patulin quantification in commercial apple juice. *Food Chem Toxicol* 2008 JUN;46(6):2251-7.
129. Moukas A, Panagiotopoulou V, Markaki P. Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. *Food Chem* 2008 AUG 15;109(4):860-7.
130. Gashlan H. High performance liquid chromatographic determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Saudi Arabia. *Scientific Research and Essays* 2009 FEB;4(2):69-72.

131. European Committee for Standardization EN 14177: Foodstuffs - Determination of patulin in clear and cloudy apple juice and puree - HPLC method with liquid-liquid partition clean-up, (2003).
132. Wallemacq P. Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. Where are we? *Clin Chem Lab Med* 2004;42(11):1204-11.
133. Togola A, Budzinski H. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. *Analytical and Bioanal Chem* 2007;388(3):627-35.
134. Soriano T, Jurado C, Menéndez M, Repetto M. Improved Solid-Phase Extraction Method for Systematic Toxicological Analysis in Biological Fluids. *J Anal Toxicol* 2001 March;25:137-43.
135. Majors R. Advanced topics in solid-phase extraction: Chemistries. *LC GC Europe* 2007 MAY;20(5):266-+.
136. Eisele T, Gibson M. Syringe-cartridge solid-phase extraction method for patulin in apple juice. *JAOAC Int* 2003 NOV-DEC;86(6):1160-3.
137. Almeida C, Serôdio P, Nogueira J. Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica. *Química* 2004;95(69-77).
138. Castilho M, Ramos F, Silveira M. Extracção em fase sólida (EFS): tipos de enchimento. *Boletim Sociedade Portuguesa Química* 1995;59:38-45.
139. Labs® R. Products: clean-up columns. Washington, DC [26-02-09]; Available from: <http://www.romerlabs.com/mycotoxins.html>.
140. Henriques MLGS. Dissertação para obtenção do grau de Mestre: Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: optimizaçãodo método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2008.
141. Alvito P, Sizoo E, Almeida C, van Egmond HFAM. Occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Baby Foods in Portugal. *F Anal Methods* 2008;in press, DOI: 10.1007/s12161-008-9064-x.
142. Chan D, MacDonald S, Boughtflower V, Brereton P. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 2004;1059:13-6.

143. Stroka J, van Otterdijk R, Anklama E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *J Chromat A* 2000;904:251-6.
144. Lombaert G, Pellaers P, Roscoe V, Mankotia M, Neil R, Scott P. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Addit Contam* 2003 MAY;20(5):494-504.
145. Solfrizzo M, De Girolamo A, Visconti A. Determination of fumonisins B1 and B2 in cornflakes by high performance liquid chromatography and immunoaffinity clean-up. *Food Addit Contam* 2001;18(3):227-35.
146. Lattanzio VMT, Pascale M, Visconti A. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *Trends Anal Chem*, Vol 28, No 6, 2009;28(6):758-68.
147. Arranz I, Derbyshire M, Kroeger K, Mischke C, Stroka J, Anklam E. Liquid chromatographic method for quantitation of patulin at 10 ng/mL in apple-based products intended for infants: Interlaboratory study. *J AOAC Int*. 2005 MAR-APR ;88(2):518-25.
148. Kawamoto Y, Bando S, Higashihara K, Miyagawa H, Goto T. Development and single laboratory validation of a method for patulin determination in fruit juices. *World Mycotoxin Journal* 2008;1(1):59-65.
149. Katerere D, Stockenstrom S, Balducci G, Shephard G. Determination of patulin in apple juice: Comparative evaluation of four analytical methods. *J AOAC Int* 2007 JAN-FEB;90(1):162-6.
150. Katerere D, Stockenstrom S, Shephard G. HPLC-DAD method for the determination of patulin in dried apple rings. *Food Control* 2008 APR;19(4):389-92.
151. Funes G, Resnik S. Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. *Food Control* 2009 MAR;20(3):277-80.
152. Iha MH, de Souza SVC, Sabino M. Single-laboratory validation of a liquid chromatography method for the determination of patulin in apple juice. *Food Control* 2009 JUN;20(6):569-74.
153. Rychlik M, Schieberle P. Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay. *J AgricFood Chem* 1999 SEP;47(9):3749-55.
154. Rychlik M, Asam S. Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *Anal Bioanal Chem* 2008 JAN ;390(2):617-28.

155. Rosinska D, Vierikova M, Lehotay J. Determination of Patulin in Apple Products using HPLC with Photodiode Array Detector and Ultra Performance Liquid Chromatography with Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *J Liq Chromatogr Related Technol* 2009;32(4):500-11.
156. NP EN ISO/IEC 17025: 2005, Requisitos gerais de competência para laboratórios. IPQ; 2005.
157. Thompson M, Ellison S, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem* 2002 MAY;74(5):835-55.
158. RELACRE. Guia RELACRE 13 Validação de métodos internos de ensaio em análise química. Fevereiro 2000 ed: Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal; 2000.
159. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics. 1998 [20-01-09]; Available from: <http://www.eurachem.org/guides/mval.htm>.
160. Rodrigues A. validação de métodos cromatográficos (aplicações), Specanalítica. 2007.
161. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Decisão (CE) nº 657/2002 da Comissão de 12 Agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados, L221/8-L221/36 (2002).
162. Almeida CMM, Bronze MR. Validação de metodologias analíticas. *Cadernos de Formação da Ordem dos Farmacêuticos: Ordem dos Farmacêuticos*; 2005.
163. EURACHEM. Guide to quality in analytical chemistry. 2002 [20-01-09]; Available from: <http://www.eurachem.org/guides/accr.htm>.
164. International Organization for Standardization ISO. Water Quality - calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1 : statistical evaluation of the linear calibration function. ISO 8466-1. Geneva 1990.
165. van Trijp J, AH R. RIKILT-DLO, Model for the calculation of calibration curves, RIKILT report 91.02. Wageningen, The Netherlands. 1991.
166. International Organization for Standardization ISO. Shewhart control charts. ISO 8258. Geneva 1991.

167. EURACHEM. Selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes by laboratories. 2000 [27-07-09]; Available from: <http://www.eurachem.org/guides/ptguide2000.pdf>.
168. Arranz I, Stroka J, Derbyshire M, Kroeger K, Mischke C, Anklam E. Determination of patulin in apple juice and fruit puree by liquid-liquid extraction and solid phase extraction with liquid chromatography using ultraviolet absorption: colaborative study. European Commission, JRC, IRMM, 2004.
169. International Organization for Standardization ISO. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions. ISO 5725-1. Geneva 1994.
170. International Organization for Standardization ISO. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. ISO 5725-2. Geneva 1994.
171. International Organization for Standardization ISO. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. ISO 5725-3. Geneva 1994.
172. International Organization for Standardization ISO. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method. ISO 5725-4. Geneva 1994.
173. International Organization for Standardization ISO. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6: Use in paractice of accuracy values. ISO 5725-6. Geneva 1994.
174. Prieta J, Moreno M, Diaz S, Suarez G, Dominguez L. Survey of patulin in apple juice and childrens apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. J Agric Food Chem 1994 AUG;42(8):1701-3.
175. Guia ISO/IEC 99, Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), IPQ, 2008.

Anexos

Anexo 1 - Características dos sumos e purés analisados.

Tabela A1.1a: Características das amostras de sumos límpidos

Código Amostra	Origem	Amostra	Emb	Grupo etário recomendado	Ingredientes
07-0185	C	Sumo de maçã	125 mL	> 4 meses	Sumo de maçã à base de concentrado, vitamina C
07-0199	B	Sumo maçã	1000 mL	N/A	Sumo de maçã filtrado feito a partir de sumo concentrado
07-0201	C	Sumo maçã 100%	1000 mL	N/A	Sumo de maçã (à base de sumo concentrado), ácido cítrico e ácido ascórbico
07-0202	C	Sumo maçã	1000 mL	N/A	Água, açúcar, sumo de maçã, ácido cítrico
07-0204	C	Sumo maçã 100%	1000 mL	N/A	Sumo maçã concentrado
07-0206	C	Sumo maçã 100%	1000 mL	N/A	Sumo de maçã à base concentrado, ácido cítrico, ácido Ascórbico
07-0207	C	Sumo de maçã	1000 mL	N/A	Sumo de maçã à base de sumo de maçã concentrado
07-0208	C	Sumo maçã	1000 mL	N/A	Sumo de maçã à base de concentrado e menos de 15g açúcar por litro
07-0217	C	Sumo maçã 100%	200 mL	N/A	Sumo 100% maçã
07-0239	C	Sumo maçã 100%	1000 mL	N/A	Sumo 100% maçã
08-0001	C	Sumo de maçã	1000mL	N/A	Sumo de maçã à base de sumo concentrado
08-0002	C	Sumo de maçã	1000 mL	N/A	Sumo de maçã à base de concentrado com vitamina C
08-0003	C	Sumo de maçã	250 mL	N/A	Sumo de maçã à base de sumo concentrado. Percentagem de fruta: 100%
08-0125	C	Sumo 100% maçã	1000 mL	N/A	Sumo de maçã à base concentrado, ácido cítrico, ácido ascórbico

B - Biológico; C - Convencional; N/A - Não aplicável

Tabela A1.1b: Características das amostras de sumos límpidos (cont.).

Código Amostra	Origem	Amostra	Emb	Grupo etário recomendado	Ingredientes
08-0131	C	Sumo 100% maçã	200 mL	N/A	Sumo de maçã à base concentrado, ácido cítrico, ácido ascórbico
08-0132	C	Sumo de maçã	130 mL	> 4 meses	Sumo concentrado de maçã e vitamina C
08-0133	C	Sumo de maçã	125 mL	> 4 meses	Sumo de maçã à base de concentrado, vitamina C
08-0174	B	Sumo de maçã	250 mL	N/A	100% maçã
2421	C	Sumo de maçã 100%	1000 mL	N/A	Sumo de maçã (à base de sumo concentrado), ácido cítrico e ácido ascórbico
2422	C	Sumo maçã 100%	1500 mL	N/A	Sumo de maçã à base de concentrado pasteurizado
2431	C	Sumo de maçã	1000 mL	N/A	Sumo de maçã à base de sumo concentrado
2432	C	Sumo de maçã 100%	1000 mL	N/A	Sumo de maçã à base de sumo concentrado
2433	C	Sumo de maçã	1000 mL	N/A	Maçã
2443	C	Sumo de maçã	125 mL	> 4 meses	Sumo de maçã à base de concentrado
2752	C	Sumo de maçã	125 mL	> 4 meses	Sumo de maçã à base de concentrado
2753	C	Sumo de maçã	130 mL	> 4 meses	Sumo concentrado de maçã
3269	C	Sumo de maçã	130 mL	> 4 meses	Sumo concentrado de maçã
3270	C	Sumo de maçã	130 mL	> 4 meses	Sumo concentrado de maçã
3271	C	Sumo de maçã	125 mL	> 4 meses	Sumo de maçã à base de concentrado
3272	C	Sumo de maçã	125 mL	> 4 meses	Sumo de maçã à base de concentrado
3273	C	Sumo de maçã	125 mL	> 4 meses	Sumo de maçã à base de concentrado

B - Biológico; C - Convencional; N/A - Não aplicável

Tabela A1.2a: Características das amostras de sumos turvos.

Código Amostra	Origem	Amostra	Emb	Grupo etário recomendado	Ingredientes
07-0198	B	Sumo Kid's Cocktail	200 mL	N/A	Sumo puro e puré de frutos: maçã, laranja, banana, morango, manga e framboesa
07-0200	B	Sumo maçã, Manga	700 mL	N/A	Maçã (73%) e manga(27%) biológicas
07-0203	C	Sumo Maçã Bravo de Esmolfe	1000 mL	N/A	Sumo e polpa de maçã bravo de esmolfe, água, açúcar, ácido cítrico e ácido ascórbico
07-0212	B	Sumo Maçã, Manga	750 mL	N/A	Sumo de maçã 75%, polpa manga 25%
07-0213	B	Sumo Maçã, Banana	750 mL	N/A	Sumo de maçã 63%, puré de banana 35%, puré de acerola 2%
07-0214	B	Sumo de Maçã	1000 mL	N/A	Sumo de maçã de agricultura biológica
07-0215	B	Sumo de Maçã	1000 mL	N/A	Sumo de maçã de agricultura biológica
07-0216	B	Cocktail Bio Frutos Amarelos	500 mL	N/A	Sumo puro maçãs (67%), sumo puro laranja (10%), sumo puro ananás (10%), sumo puro banana (10%), sumo puro acerola (3%)
08-0039	C	Sumo fresco laranja-maçã	750 mL	N/A	Laranja 50%, Maçã 50%
08-0040	C	Sumo fresco maçã-cenoura	750 mL	N/A	Maçã 90%, Cenoura 10%
08-0041	C	Sumo fresco maçã-ananás	750 mL	N/A	Maçã 80%, Ananás 20%
08-0042	C	Sumo fresco maçã-morango	750 mL	N/A	Maçã 80%, Morango 20%
08-0043	C	Sumo fresco maçã	750 mL	N/A	Maçãs produzidas em protecção integrada
08-0103	C	100% Sumo Maçã	1000 mL	N/A	100% sumo pasteurizado de maçã, sem adição de açúcar
08-0104	C	100% Sumo Maçãs Frescas	750 mL	N/A	Maçãs

B - Biológico; C - Convencional; N/A - Não aplicável

Tabela A1.2b: Características das amostras de sumos turvos (cont).

Código Amostra	Origem	Amostra	Emb	Grupo etário recomendado	Ingredientes
08-0105	B	Sumo Maçã Puro	200 mL	N/A	100% Sumo puro de maçã de agricultura biológica
08-0171	B	Sumo de Maçã e Sabugueiro Biológico	700 mL	N/A	Maçã 67%, sabugueiro 33%
08-0172	B	Sumo de Maçã e Manga Biológico	700 mL	N/A	Maçã e manga biológicas, 100% sumo de fruta natural
08-0173	B	Sumo de Maçã Biológico	200 mL	N/A	100% Maçã biológica
08-0175	B	Sumo de Maçã Biológico	1000 mL	N/A	100% Maçã biológica
08-0176	B	Sumo Smoothie Maçã Banana Baunilha	330 mL	N/A	Sumo de Maçã 49,96%, puré de banana 30%, puré de maçã 20%, baunilha em pó 0,04%
2412	C	Sumo Natural de Maçã	750 mL	N/A	Maças
2413	C	Sumo Natural de Maçã-Cenoura	750 mL	N/A	Maçã 90%, cenoura 10%
2414	B	Sumo de Maçã 100%	1000 mL	N/A	Sumo puro de maçã de agricultura biológica
2416	C	Sumo Maçã	220 mL	N/A	Polpa de maçã 70%, sumo de maçã 29%, ácido ascórbico
2418	C	Sumo Maçã Morango Banana e Laranja	250 mL	N/A	Maçã 50%, morango 25%, banana 15%, laranja 10%, conservante: ácido ascórbico
2419	C	Sumo Maçã Banana e Manga	250 mL	N/A	Maçã 60%, manga 35%, banana 5%, ácido ascórbico
2420	C	Sumo Maçã Cenoura Banana e Manga	250 mL	N/A	Maçã 60%, cenoura 20%, banana 10%, manga 10%, conservante: ácido ascórbico
2424	C	Sumo Natural Maçã, Cenoura	250 mL	N/A	Maçã 90%, Cenoura 10%
2425	C	Sumo Natural Maçã,	250 mL	N/A	Maçã 100%

B - Biológico; C - Convencional; N/A - Não aplicável

Tabela A1.2c: Características das amostras de sumos turvos (cont.).

Código Amostra	Origem	Amostra	Emb	Grupo etário recomendado	Ingredientes
2426	C	Sumo Natural Maçã, Cenoura	250 mL	N/A	Maçã 90%, Cenoura 10%
2427	C	Sumo Natural Maçã	250 mL	N/A	Maçã 100%
2428	C	Sumo Natural Maçã, Ananás	250 mL	N/A	Maçã 80%, Ananás 20%
2429	C	Sumo Natural Maçã, Laranja	250 mL	N/A	Maçã 50%, laranja 50%
2430	C	Sumo Maçã, Morango	220 mL	N/A	Polpa de maçã 38%, sumo de maçã 32%, polpa de morango 27%, polpa de acerola
2440	C	Sumo Natural Maçã	250 mL	N/A	Maças
2441	C	Sumo Fresco de Maçã	250 mL	N/A	Maças
3092	B	Sumo de Maçã	1000 mL	N/A	100% sumo de maçã proveniente de agricultura biológica
3274	C	Sumo de maçã e limão	250 mL	N/A	Maças 90%, limão 10%
3365	C	Sumo de maçã	1000 mL	N/A	100% sumo pasteurizado de maçã

B - Biológico; C - Convencional; N/A - Não aplicável

Tabela A.1.3a: Características das amostras de purés.

Código Amostra	Origem	Amostra	Emb	Grupo etário recomendado	Ingredientes
07-0050	B	Puré Maçã-Banana	190 g	> 4 meses	Maçãs, bananas, água, farinha de arroz
07-0051	B	Puré Cenoura com Maçã	190 g	> 4 meses	Cenouras, maçãs, água
07-0052	B	Puré Pêra-Maçã	190 g	> 4 meses	Pêras, maçãs, água, farinha de aveia, concentrado de pêra
07-0058	C	Puré Maçã-Banana	100 g	4 - 36 meses	Maçã (76%), banana (20%), sumo concentrado de maçã (4%), vit C.
07-0059	C	Puré Maçã	130 g	> 4 meses	Maçã (64%), água, sacarose, farinha e amido de arroz, limão, vitamina C e aroma de baunilha
07-0060	C	Puré Maçã-Marmelo	130 g	> 4 meses	Polpa de maçã (74,2%), puré de marmelo (18,2%), água, sumo de uva concentrado, vitamina C.
07-0061	C	Puré Maçã	130 g	> 4 meses	Maçã 98,7%, açúcar, espessante: farinha de semente de alfarroba, vitaminas: C;B1, B2, PP,B6, biotina, ácido pantoténico
07-0062	C	Puré Maçã-Kiwi	130 g	> 8 meses	Maçãs (80%), Kiwis (10%), ananás, espessante: farinha de sementes de alfarroba, vitaminas: C;B1, B2, PP,B6, biotina, ácido pantoténico
07-0067	B	Puré Maçãs Baunilha	130 g	> 4 meses	Maçãs d'Emilie Romagne (99,97%), Baunilha (0,03%)
07-0068	B	Puré Maçãs Banana	130 g	> 4 meses	Maçãs d'Emilie Romagne (85%), Bananas d'Equador (15%)
07-0069	C	Puré de Pêra Maçã	130 g	> 4 meses	Puré de maçã (75%), puré de pêra (22%), mel (2,5%), vitamina C, sumo de limão concentrado.
07-0070	C	Puré de Maçã Laranja Banana	100 g	4 - 36 meses	Maçã (72%), Banana (20%), sumo concentrado de laranja (6%), sumo concentrado de maçã (2%), vitamina C.
07-0071	C	Puré de Maçã, Banana Morango	130 g	> 4 meses	Maçã (76,8%), Banana (13%), Morango (10%), espessante: farinha de semente de alfarroba, vitamina C, B1, B2, PP, B6, biotina, ácido pantoténico
07-0163	C	Puré Maçã, Manga	100 g	> 8 meses	Maçã (86%), manga (13,9%), vit C
07-0165	C	Puré Maçã, Pêssego	100 g	> 6 meses	Maçã (76%), pêssego (18%), mel (4%), sumo maçã conc, vitamina C

B - Biológico; C - Convencional; N/A - Não aplicável

Tabela A.1.3b: Características das amostras de purés (cont.).

Código Amostra	Origem	Amostra	Emb	Grupo etário recomendado	Ingredientes
07-0166	C	Puré Maçã, Banana, Morango	130 g	> 4 meses	Maçã (76,8%), Banana (13%), Morango (10%), espessante: farinha de semente de alfarroba, vitamina C, B1, B2, PP, B6, biotina, ácido pantoténico
07-0167	C	Puré Maçã, Pêra	100 g	4-36 meses	Maçã (65%), pêra (28%), sumo conc maçã (7%), vitamina C
07-0168	C	Puré Maçã, Pêra	100 g	> 4 meses	Maçã (66,5%), pêra (30%), sumo maçã conc, vitamina C
07-0169	C	Puré Maçã, Marmelo	130 g	> 4 meses	Puré Maçã (74,2%), puré marmelo (18,2%), água, sumo de uva conc, vitamina C
07-0170	C	Puré Maçã, Banana	100 g	4-36 meses	Maçã (76%), banana (20%), sumo concentrado de maçã (4%), vit C.
07-0171	C	Puré Maçã, Banana	130 g	> 4 meses	Maçã (79,8%), banana (20%), espessante: farinha de sementes alfarroba, vitaminas C, B1, B2, PP, B6, Biotina, Ácido pantoténico
07-0172	C	Puré Frutos Variados	100 g	6-36 meses	Maçã (56%), pêra (17,5%), alperce (12%), banana (9%), sumo conc maçã (4%), sumo conc laranja (1,5%), vit C
07-0175	C	Puré Maçã, Kiwi	130 g	> 8 meses	Maçã (80%), kiwi (10%), ananás, espessante: farinha de sementes alfarroba, vitaminas C, B1, B2, PP, B6, Biotina, Ácido pantoténico
07-0177	C	Puré Maçã	125 g	> 4 meses	Maçã em puré 55%, água, farinha de arroz, sacarose, sumo de limão concentrado e ácido ascórbico.
07-0179	C	Puré Maçã, Laranja, Banana	100 g	6-36 meses	Maçã (72%), Banana (20%), sumo concentrado de laranja (6%), sumo concentrado de maçã (2%), vitamina C.
07-0180	C	Puré Maçã, Pêssego	90 g	> 15 meses	Maçã (66,9%), pêssego (29%), sumo concentrado de maçã, vitamina C
07-0181	C	Puré Maçã, Pêra	90 g	> 15 meses	Maçã (66,4%), pêra (30%), sumo concentrado maçã, vitamina C
07-0182	C	Puré Frutos Variados	90 g	> 15 meses	maçã (56%), pêra (18%), alperce (12%), banana, 1 colher chá sumo conc maçã e laranja (5%), vit C
07-0193	B	Puré Maçã, Baunilha	130 g	> 4 meses	Maças (99,97%), Baunilha (0,03%)

B - Biológico; C - Convencional; N/A - Não aplicável

Tabela A.1.3c: Características das amostras de purés (cont.).

Código Amostra	Origem	Amostra	Emb	Grupo etário recomendado	Ingredientes
07-0195	B	Puré Maçã, Alperce e Cereais	130 g	> 4 meses	Maçãs (60%), Alperce (37%), Farinha de arroz (3%)
07-0196	B	Puré Maçã, Mirtilos	130 g	> 4 meses	Maçãs 80%, Mirtilos 20%
07-0197	B	Puré Maçã, Banana	130 g	> 4 meses	Maçã 85%, banana 15%
07-0210	C	Puré Maçã, laranja, banana e bolacha	200 g	> 6 meses	Maçã (58%), água de cozedura, sumo laranja (9%), banana (9%), açúcar (7%), farinha de arroz, amido de milho, bolacha sem glúten 1% e vitamina C
07-0234	B	Puré Maçã Banana Alperce	190 g	> 4 meses	Água, maçãs 26%, banana 16%, sumo pêra concentrado, amido de arroz, alperce, sumo de limão
08-0004	C	Compota Maçã Banana	90 g	> 8 meses	Maçãs 77,3%, Banana 20,3%, açúcar, ácido ascórbico, ácido cítrico
08-0005	C	Compota 3 Maçãs	90 g	> 8 meses	Maçã 95,4%, açúcar, ácido ascórbico
08-0006	B	Compota Maçã	90 g	> 8 meses	Maçã 96%, Concentrado fruta (uva e limão) 4%
08-0007	B	Compota Maçã Morango Mirtilho	90 g	> 8 meses	Maçã 67%, Morangos 20%, Concentrado de fruta, Mirtilo 3%, Sumo de Acer
08-0008	B	Compota Maçã Pêssego Alperce	90 g	> 8 meses	Maçã 61%, Pêssego 18%, Concentrado de fruta, Alperce 9%, Sumo de Acer
08-0124	C	Puré Maçã	130 g	> 4 meses	Maçã golden (100%), vitaminas: C, B1, B2, PP, B6, Biotina, ácido pantoténico
08-0130	C	Puré Maçã	130 g	> 4 meses	Maçã golden (100%), vitaminas: C, B1, B2, PP, B6, Biotina, ácido pantoténico
08-0134	C	Puré Maçã, Banana	100 g	> 4 meses	Maçã (74,9%), Banana (25%), vitamina C
08-0135	C	Puré Maçã, Maracujá	100 g	> 6 meses	Maçãs 79,7%, água, maracujás 5,5%, sacarose, nata (do leite) 2%, amido de mandioca, vitaminas: C, B1, B2, PP, B6, biotina e ácido pantoténico

B - Biológico; C - Convencional; N/A - Não aplicável

Tabela A.1.3d: Características das amostras de purés (cont.).

Código Amostra	Origem	Amostra	Emb	Grupo etário recomendado	Ingredientes
08-0136	C	Puré Maçã Morango	100 g	> 6 meses	Maçãs (60%), Morangos (27%), Bananas, vitaminas: C, B1, B2, PP, B6, biotina, ácido pantoténico
08-0137	C	Puré Maçã, banana	130 g	> 4 meses	Maçãs (79,8%), Bananas (20%), espessante: farinha de sementes de alfarroba, vitaminas: C, B1, B2, PP, B6, biotina, ácido pantoténico
08-0138	C	Puré Maçã Banana	100 g	> 6 meses	Maçãs 73,4%, água,, bananas 14%, sacarose, nata (do leite) 2%, amido de mandioca, sumo de limão concentrado, vitaminas: C, B1,B2,PP, B6, biotina e ácido pantoténico
08-0139	C	Puré Maçã Banana	100 g	4 - 36 meses	Maçã (76%), banana (20%), sumo concentrado de maçã (4%), vit C.
08-0140	C	Puré Maçã, Banana, Morango	130 g	> 4 meses	Maçã 76,8%, bananas 13%, morangos 10%
08-0143	C	Puré Maçã Bolacha	100 g	> 6 meses	Maçãs 70%, água, bolacha 6%, açúcar, acidificante, espessante, vitaminas C, B1, B2, PP, B6
08-0144	C	Puré Maçã Banana	100 g	> 4 meses	Maçã 70%, banana 30%, sumo de limão concentrado, vitamina C
08-0145	C	Puré Maçã Pêssego	100 g	> 6 meses	Maçã 78%, puré de pêssego 18%, mel e vitamina C
08-0146	C	Puré Maçã Banana Morango	100 g	> 8 meses	Maçã 53%, puré de banana 27%, morango 20%, vitamina C
08-0147	C	Puré Maçã Pêra	100 g	> 6 meses	Maçã 48%, pêras 36%, água, sacarose, nata 2,3%, amido de mandioca
08-0148	C	Puré Maçã Alperce	100 g	> 6 meses	Maçãs 58%, alperces 25%, sacarose, água , nata 3,5%, amido de mandioca
08-0149	C	Puré Maçã Kiwi Banana Bolacha	100 g	> 8 meses	Maçãs 50%, água, kiwi 12%, bananas 8%, bolacha 6%
08-0150	C	Puré Maçã Kiwi	130 g	> 8 meses	Maçã (80%), Kiwi (10%), ananás, espessante: farinha de sementes alfarroba, vitaminas C, H, B1, B2, B3, B5 e B6.
08-0151	C	Salada de Frutas	130 g	>4 meses	Maçãs 55,6%, pêras 20%, ananás 10%, bananas 7,8%, pêssegos 5%, sumo de laranja concentrado 1,3%
08-0152	B	Puré Maçã Baunilha	130 g	> 4 meses	Maçãs d'Emilie Romagne 99,97%, baunilha d'Bourbon 0,03%

B - Biológico; C - Convencional; N/A - Não aplicável

Tabela A.1.3e: Características das amostras de purés (cont.).

Código Amostra	Origem	Alimento	Emb	Grupo etário recomendado	Ingredientes
08-0153	B	Puré Maçã Banana	130 g	> 4 meses	Maçãs d'Emilie Romagne 85%, bananas d' Equateur 15%
08-0154	C	Puré Maçã	100 g	4-36 meses	Maçã 93%, sumo concentrado de maçã 7%, vitamina C
08-0155	C	Puré Maçã Pêra	130 g	> 4 meses	Maçãs 64.7%, pêras 35%, espessante: farinha de sementes de alfarroba, vitaminas: C, B1, B2, PP, B6
08-0156	C	Puré Maçã	130 g	> 4 meses	Maçã 75%, sumo concentrado de maçã 24,9%
08-0157	C	Puré Maçã Pêra	100 g	4-36 meses	Maçã (65%), pêra (28%), sumo conc maçã (7%), vitamina C
08-0159	C	Puré Maçã Laranja Banana	100 g	6-36 meses	Maçã 72%, banana 20%, sumo concentrado laranja 6%, sumo concentrado maçã 2%, vitamina C
08-0160	C	Puré Maçã Manga	100 g	> 8 meses	Maçã 86%, manga 13,9%, vitamina C
08-0161	C	Puré Maçã Pêra	100 g	> 4 meses	Maçã 69,9%, pêra 30%, vitamina C
2423	C	100% Fruta Maçã, Pêssego	90 g	> 15 meses	Maçã (66,9%), pêssego (29%), sumo concentrado de maçã, vitamina C
2442	C	100% Fruta Maçã, Pêra	90 g	> 15 meses	Maçã (66,4%), pêra (30%), sumo concentrado maçã, vitamina C
2446	C	Compota de Maçã	90 g	N/A	Maçã 95,4%, açúcar, ácido ascórbico
2448	C	Puré de Banana e Maçã	120 g	> 6 meses	Puré de banana 51%, puré de maçã 49%, ácido ascórbico, sumo de limão concentrado
2449	C	Puré Multifrutos	120 g	> 6 meses	Puré de maçã 55,9%, puré de pêra 20%, puré de ananás 10%, puré de banana 7,8%, sumo de laranja 1,3%, ácido ascórbico
2450	C	Compota de Maçã Banana	90g	N/A	Maçãs 77,3%, Banana 20,3%, açúcar, ácido ascórbico, ácido cítrico
2451	C	Puré de Maçã	120 g	> 4 meses	Maçã 99%, ácido ascórbico, sumo de limão concentrado
2453	C	Compota de Maçã	100 g	N/A	Maçãs 88%, açúcar, antioxidante E300

B - Biológico; C - Convencional; N/A - Não aplicável

Anexo 2 - Método dos mínimos quadrados (164)

A forma algébrica da equação de uma recta é dada por:

$$y = bx + a \quad (\text{equação 17})$$

Onde:

b Declive da recta.

a Ordenada na origem.

x Valores individuais de concentração conhecida na solução padrão.

Esta recta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes, $(x_1, y_1); \dots; (x_n, y_n)$ onde n é o número de pontos da recta. A média dos valores de x (concentração dos padrões utilizados) representa-se por \bar{x} e a média dos valores de y (sinal instrumental) representa-se por \bar{y} , e a posição (\bar{x}, \bar{y}) é designada por centróide.

O cálculo do coeficiente de correlação, R , pode ser usado como um dos parâmetros para avaliar uma calibração analítica:

$$R = \frac{\sum_i \left\{ \left(x_i - \bar{x} \right) \left(y_i - \bar{y} \right) \right\}}{\sqrt{\left[\left\{ \sum_i \left(x_i - \bar{x} \right)^2 \right\} \left\{ \sum_i \left(y_i - \bar{y} \right)^2 \right\} \right]}} \quad (\text{equação 18})$$

As curvas de calibração devem apresentar valores de coeficiente de correlação superiores a 0,995, no entanto quanto mais próximo do valor de 1 (correlação positiva) ou de -1 (correlação negativa) estiver este coeficiente maior será a qualidade dos resultados. Para o cálculo do coeficiente de correlação é necessário ter em conta algumas precauções para que não se cometam erros de interpretação, pois um bom coeficiente correlação não é sinónimo da existência de uma relação linear. Assume-se ainda que todos os erros associados aos valores de x são desprezáveis face aos valores de y .

O coeficiente de determinação da recta (R^2) é dado pelo quadrado do coeficiente de correlação.

Neste método demonstra-se que os coeficientes a e b da recta de regressão de y em x , são dados por:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N \left[\left(x_i - \bar{x} \right) \left(y_i - \bar{y} \right) \right]}{\sum_{i=1}^N \left(x_i - \bar{x} \right)^2} \quad (\text{equação 19})$$

$$a = \bar{y} - b \bar{x}$$

Onde:

- x Valores individuais de concentração conhecida na solução padrão.
- y Valores individuais do sinal instrumental.
- \bar{x} Média dos valores de x (concentração dos padrões utilizados).
- \bar{y} Média dos valores de y (sinal instrumental).

Os coeficientes a e b dão uma estimativa verdadeira da função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ($s_{y/x}$) da recta de regressão:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx_i)]^2}{N - 2}} \quad (\text{equação 20})$$

Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal em torno da curva de calibração. Os desvios padrão de declive, s_b , e da ordenada da origem, s_a , são dados por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{equação 21})$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{equação 22})$$

e podem ser usados para calcular os limites de confiança de a e b :

$$b \pm tS_b \quad (\text{equação 23}) \quad a \pm tS_a \quad (\text{equação 24})$$

sendo t o valor da variável de *Student* para o nível de confiança desejado de $(n-2)$ graus de liberdade.

Cálculo da concentração

Após ter determinado o declive e a ordenada na origem de uma recta de regressão, pode-se calcular o valor de x correspondente a um valor médio de y . A concentração de uma amostra por interpolação da curva de calibração é calculada pela seguinte equação:

$$x_i = \frac{y_i - a}{b} \quad (\text{equação 25})$$

Desvio Padrão do método (S_m)

Este parâmetro permite ao analista verificar a qualidade do seu trabalho:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b} \quad (\text{equação 26})$$

Coeficiente de variação do método (CV_m)

Este parâmetro permite comparar diferentes calibrações e métodos analíticos e é expresso pela equação (em %):

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{equação 27})$$

Anexo 3 - Teste das áreas normalizadas (123, 140)

A distribuição dos valores normalizados tem como objectivo avaliar a dispersão dos valores obtidos na calibração em relação aos valores óptimos, por forma a que não seja superior a um intervalo previamente estabelecido.

A partir da equação da recta obtida na regressão linear, estimaram-se as áreas de pico, para as concentrações usadas. Para cada uma destas áreas, calculou-se a razão entre o valor de área obtida experimentalmente e o valor da área estimada através da regressão linear.

A concentração para a qual esta razão se aproxima mais de 1 é denominada C_{100} , ou seja é a concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação. Aplicou-se então a equação 28 a cada uma das concentrações:

$$\text{Área Normalizada} = \frac{\left(\frac{A_i}{C_i}\right) \times (100 \times C_{100})}{A_{100}} \quad (\text{equação 28})$$

Sendo:

A_i Área do pico correspondente a uma determinada concentração.

C_i Concentração correspondente à área A_i .

A_{100} Área do pico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação.

C_{100} Concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação.

Após o cálculo destes valores, foi traçado um gráfico de valores normalizados *versus* a concentração ($\mu\text{g/L}$).

Para admitir a existência de linearidade, numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores normalizados não podiam ter um desvio superior a 10% isto é, deverão estar compreendidos entre 90 e 110%.

Sempre que existirem valores normalizados que apresentem um desvio superior a 10% devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando-se novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos.

Anexo 4 - Análise de resíduos (140)

Um bom indicador da linearidade é a determinação dos resíduos, a qual se baseia na avaliação da distância entre os valores de y experimentais e os valores y' ideais da recta de calibração. Uma representação gráfica destes valores em função das concentrações deve dar origem a um conjunto de pontos que se dispõem aleatoriamente em torno do eixo dos x . Caso contrário poderá ser indicativo de que a função que melhor se ajusta ao conjunto de pontos experimentais poderá ser uma curva e não uma recta.

Para admitir a existência de linearidade numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores deviam ter um desvio igual ou inferior a 10%, ou seja, estar compreendidos entre 0 e 10%. Sempre que existirem resíduos que apresentem um desvio superior a 10% devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando-se novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos.

Calcula-se a área estimada (y') com base na equação da recta obtida para o composto em questão:

$$y' = bx + a \quad (\text{equação 17})$$

Onde:

- a Ordenada na origem (correspondente à equação da recta de calibração para composto).
- b Declive da recta.
- x Valores individuais de concentração conhecida na solução padrão.

O resíduo representa o quociente entre os valores experimentais e os valores estimados da área da recta de calibração, em percentagem.

Após o cálculo destes valores, foi traçado um gráfico de resíduos (%) *versus* concentração ($\mu\text{g/L}$).

Anexo 5 - Teste de RIKILT (165)

O teste de RIKILT permite a análise da linearidade em cada ponto da recta de calibração. Para isso, traçar um gráfico da linearidade de modo a avaliar o seu comportamento linear. Para cada concentração x , e para cada sinal instrumental y , determinar a razão y/x .

Calcular a média de todas as razões y/x para todos os pontos de calibração ($\overline{y/x}$). Ao valor médio atribuir um valor de 100% e calcular a percentagem de cada valor y/x em relação ao valor médio, através da expressão:

$$y/x (\%) = 100 \times \frac{(y/x)}{\overline{y/x}} \quad (\text{equação 29})$$

No eixo das abcissas colocar o valor das concentrações e no eixo das ordenadas o valor, em percentagem, da razão y/x .

Para uma linearidade perfeita, cada ponto de calibração, deveria dar um valor de 100%. Para admitir linearidade numa determinada gama de trabalho, definiu-se que a razão percentual de y/x não deve apresentar um valor de desvio superior a 10%, ou seja, os valores devem estar entre 90 e 110%. Caso exista valores que se encontrem fora deste intervalo, esses valores devem ser rejeitados e o teste de RIKILT novamente aplicado à gama reduzida, até que se verifiquem os requisitos estabelecidos.

Anexo 6 - Teste de Mandel ou Teste de Fisher/Snedecor (164)

A linearidade pode ser avaliada através de um modo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1, pelo teste de Fisher/Snedecor ou teste de Mandel.

A partir do conjunto de resultados obtidos (sinal instrumental vs concentração), conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear (ISO 8466-1) e a função de calibração não-linear (ISO 8466-2), bem como os respectivos desvios padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y2} , do seguinte modo:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N-2}} \quad (\text{equação 30})$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{N-3}} \quad (\text{equação 31})$$

Em que:

- N Número de padrões de calibração.
- y_i Sinal obtido para um padrão de determinada concentração.
- \bar{y}_i Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração.
- \bar{y}_{i2} Sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração.

Calcula-se a diferença de variâncias (DS^2) através da equação 33:

$$DS^2 = (N-2) \times s_{y/x}^2 - (N-3) \times s_{y2}^2 \quad (\text{equação 33})$$

Obtém-se o valor teste, VT :

$$VT = \frac{DS^2}{s_y^2} \quad (\text{equação 34})$$

O valor teste (VT) é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor, para um grau de confiança de 95%.

Critérios de aceitação:

- a) Se $VT \leq F$: a função de calibração polinomial não conduz a um ajustamento significativamente melhor, e por isso, a função de calibração é linear.
- b) Se $VT > F$: a função de calibração é não linear e por isso a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível de forma a cumprir a alternativa a). Caso não seja possível, deverá ser utilizada uma função de calibração não linear.

Anexo 7 - Teste de homogeneidade de variâncias (164)

A gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias, quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração. O primeiro e o último ponto do intervalo de linearidade são analisados em 10 réplicas independentes. Este teste avalia se o intervalo de concentrações do intervalo de linearidade está bem ajustado, por análise das variâncias dos padrões que delimitam a recta de calibração. O valor da variância de cada padrão foi determinado, de acordo com a equação:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_i^j - \bar{y})^2}{n_i - 1} \quad (\text{equação 35})$$

Sendo

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i}$$

As variâncias foram testadas para examinar se existem diferenças significativas entre elas nos limites do intervalo de linearidade, efectuando o cálculo do valor teste VT:

$$VT = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad \text{se} \quad S_2^2 > S_1^2 \quad (\text{equação 36})$$

ou

$$VT = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{se} \quad S_1^2 > S_2^2$$

O valor VT é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, de acordo com o número de graus de liberdade envolvidos, para um grau de confiança de 99%.

- Se $VT \leq F(v1; v2; 0,99)$, a diferença entre as variâncias não é significativa, logo a gama está bem ajustada.
- Se $VT > F(v1; v2; 0,99)$ a diferença entre as variâncias é significativa o o que implica que a gama de trabalho tem que ser reduzida, até que $VT \leq F$.

Nota: $v1, v2 = (n-1)$ e $F 0,99 = 5,35$, para $n = 10$

Anexo 8 - Teores máximos de micotoxinas em alimentos (9)

Tabela A8.1a - Teores máximos de micotoxinas em alimentos.

Géneros alimentícios	Teores máximos (µg/kg)		
	B1	Somatório de B1, B2, G1 e G2	M1
Aflatoxinas			
Amendoins destinados a triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização como ingrediente de géneros alimentícios	8,0	15,0	—
Frutos de casca rijas e frutos secos destinados a triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização como ingrediente de géneros alimentícios	5,0	10,0	—
Amendoins e frutos de casca rijas, frutos secos, cereais e produtos derivados da sua transformação, destinados ao consumo humano directo ou como ingrediente de géneros alimentícios	2,0	4,0	—
Milho destinado a triagem ou a outro tratamento físico antes de consumo humano ou utilização como ingrediente de géneros alimentícios; algumas especiarias	5,0	10,0	
Leite cru, leite tratado termicamente e leite para o fabrico de produtos lácteos	—	—	0,050
Alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	0,1	—	—
Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição	—	—	0,025
Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos destinados a lactentes e crianças jovens	0,10	—	0,025

Tabela A8.1b - Teores máximos de micotoxinas em alimentos (cont.).

Géneros alimentícios	Teores máximos (µg/kg)
Ocratoxina A	
Cereais não transformados	5,0
Produtos derivados de cereais não transformados, incluindo produtos à base de cereais transformados e cereais destinados ao consumo humano directo	3,0
Passas de uvas, café solúvel	10,0
Vinho, sumo de uva	2,0
Alimentos à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens; alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos destinados a lactentes e crianças jovens	0,50
Patulina	
Sumos de frutos, sumos de frutos concentrados reconstituídos e néctares de frutos; Bebidas espirituosas, sidra e outras bebidas fermentadas derivadas de maçãs ou que contenham sumo de maçã	50,0
Produtos sólidos à base de maçã, incluindo compota e puré de maçã, destinados ao consumo directo	25,0
Sumo de maçã e produtos sólidos à base de maçã, incluindo compota e puré de maçã, destinados a ser consumidos por lactentes e crianças jovens e rotulados e vendidos enquanto tal; alimentos para bebés, com excepção de alimentos à base de cereais transformados destinados a lactentes e crianças jovens	10,0
Desoxinivalenol	
Cereais não transformados, com excepção de trigo duro, aveia e milho	1 250
Trigo duro e aveia não transformados; milho não transformado	1 750
Cereais destinados ao consumo humano directo, farinha de cereais, sêmola enquanto produto final comercializado para consumo humano directo e germen; Massas alimentícias (secas)	750
Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	200

Tabela A8.1c - Teores máximos de micotoxinas em alimentos (cont.).

Géneros alimentícios	Teores máximos (µg/kg)
Zearalenona	
Cereais não transformados, com excepção do milho	100
Milho não transformado; Milho destinado ao consumo humano directo, farinha de milho, sêmola de milho, grits, gérmen de milho e óleo de milho refinado	200
Cereais destinados ao consumo humano directo, farinha de cereais, sêmola enquanto produto final comercializado para consumo humano directo e gérmen	75
Pão, produtos de pastelaria, bolachas, refeições leves à base de cereais e cereais para pequeno-almoço; refeições leves à base de milho e cereais para pequeno-almoço à base de milho	50
Alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens, incluindo alimentos transformados à base de milho	20
Fumonisin	Soma de B ₁ e B ₂
Milho não transformado	2 000
Farinha de milho, sêmola de milho, grits, gérmen de milho e óleo de milho refinado	1 000
Alimentos à base de milho para consumo humano directo com excepção dos alimentos referidos imediatamente acima e abaixo desta linha	400
Alimentos transformados à base de milho e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	200
Toxinas T-2 e HT-2	Soma das toxinas T-2 e HT-2
Cereais não transformados e produtos à base de cereais	

Anexo 9 - Procedimento de ensaio da patulina por SPE-HPLC-UV

Este anexo tem como objectivo ilustrar o procedimento de ensaio a implementar no DANEM consequência do trabalho efectuado.

Apresenta-se abaixo o modelo para a elaboração do procedimento de ensaio da patulina.



Departamento de	Procedimento de Ensaio	UUUU- PE00_ee
Laboratório de	Título	Página 191 de 240

1. Objectivo e Âmbito

2. Referências

3. Definições

4. Responsabilidades

5. Título da descrição

5.1. Subtítulo

6. Validação do Método

7. Anexos

Elaborado por:
Data: 2002-00-00

Revisto por:
Data: 2002-00-00

Aprovado por:
Data: 2002-00-00

1. Objectivo e Âmbito

Análise de patulina em sumos (lípidos e turvos) e purés à base de maçã por extracção em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por ultravioleta (HPLC-UV).

2. Referências

2.1. Bibliografia

- Arranz I, Derbyshire M, Kroeger K, Mischke C, Stroka J, Anklam E. Liquid chromatographic method for quantitation of patulin at 10 ng/mL in apple-based products intended for infants: Interlaboratory study. J AOAC Int 2005 MAR-APR;88(2):518-25 (147).
- EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics. 1998 [20-01-09]; Available from: <http://www.eurachem.org/guides/mval.htm> (159)
- Jornal Oficial da União Europeia. Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios, L70/12-34 (2006) (119).
- NP EN ISO/IEC 17025: 2005, Requisitos gerais de competência para laboratórios. IPQ; 2005 (156).
- Trucksess M. AOAC Official Method 995.10, Patulin in apple juice. Natural Toxins, vol 49, 51-53.2000 (126).
- Guia ISO/IEC 99, Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), IPQ, 2008 (175).

2.2. Instruções de trabalho

- Manual de Instruções do equipamento de HPLC
- Instruções de lavagem de material de laboratório
- Instruções de recolha selectiva de resíduos
- Obtenção de água ultra-pura
- Agitador cambalhota - Modo operativo
- Balança analítica - Modo operativo
- Espectrofotómetro de absorção molecular (Modo operativo)

- Evaporador de Azoto - Modo Operatório
- Centrífuga Eppendorf 5804R - Modo operatório

2.3. Outros documentos

- NP-104-4 - Química Planos de Normas. Parte 4: Norma de análise por HPLC
- Manual de Higiene e Segurança do laboratório
- Plano de calibração dos equipamentos

3. Definições

Para os fins do presente procedimento, aplicam-se os termos e definições relevantes da NP EN ISO/IEC 17025 e do Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) (176).

As definições de carácter geral relacionadas com a análise química constam na NP-104-4. Sempre que as definições da Norma sejam diferentes das definições incluídas no VIM é dada preferência a estas últimas.

3.1. Abreviaturas, símbolos e siglas

PAT	Patulina
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”, cromatografia líquida de alta eficiência
SPE	Solid Phase Extraction”, extracção em fase sólida
IARC	“International Agency for Research in Cancer”, Agencia Internacional de Investigação em Cancro

4. Responsabilidades

De acordo com as normas internas do INSA/DAN

5. Condições de Segurança

Todos os reagentes e equipamentos devem ser manuseados de acordo com as regras de segurança estabelecidas no Manual de Higiene e Segurança do Laboratório.

Vários ensaios de toxicidade *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a patulina apresenta efeitos mutagénicos, imunotóxicos, neurotóxicos e gastrointestinais. Os dados sobre o potencial carcinogénico da patulina são limitados, não existindo evidência de carcinogenicidade para o Homem. A IARC classificou a patulina como carcinogénico do grupo 3, isto é, não classificável quanto à sua carcinogenicidade em humanos.

Nota: Usar sempre bata e luvas. Durante a preparação de padrões utilizar como protecção suplementar uma bata verde descartável. Sempre que ocorrer transporte de padrões entre salas, este deve fazer-se dentro de contentor apropriado de modo a evitar derrames.

6. Determinação de patulina por SPE-HPLC-UV em sumos e purés à base de maçã

6.1. Fundamento do método

Este método envolve a extracção da patulina do género alimentício com mistura de solventes orgânicos (n-hexano + acetato de etilo) na presença de sulfato de sódio e hidrogenocarbonato de sódio seguida de purificação por extracção em fase sólida (SPE). O extracto purificado é evaporado até à secura em corrente de azoto e dissolvido em água pH=4. A quantificação da patulina é efectuada por HPLC com detecção por ultravioleta a um comprimento de onda de 276 nm.

6.2. Equipamento e material

Todo o material volumétrico calibrado e equipamentos utilizados devem obedecer ao plano de calibração dos equipamentos do laboratório.

6.2.1. Equipamento

- Agitador cambalhota Heidolph, modelo Reax 2
- Vortex, IKA modelo Genius 3
- Aparelho de pH com eléctrodo combinado de vidro e sonda de temperatura, Metrohm, modelo 827 pH Lab
- Balança Mettler Toledo, modelo AG 245
- Balança Mettler Toledo, Modelo PB 3002/Fact
- Banho ultrasons Grant, modelo MXB6
- Bomba de vácuo Diaphragm vacuum pump, modelo MZ 2C
- Centrifuga eppendorf, modelo 5804R

- Cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC), Waters Alliance, separation module, modelo 2695, equipado com:
 - Detector de díodos, Waters, modelo 2998
 - Bomba quaternária
 - Desgaseificador
 - Injector automático
 - Amostrador automático com capacidade para 120 amostras e controlo de temperatura programável entre 4 e 40 °C
 - Compartimento termostatzado para coluna, com temperaturas que variam entre 5 °C acima da temperatura ambiente e 65 °C
 - “Loop” de 2000 µL
 - Software Waters, Empower II versão 6.10.01.00
- Concentrador a vácuo para SPE (24 posições), Macherey-Nagel
- Evaporador de corrente azoto com banho de água Caliper, modelo Turbovap LV
- Espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific, modelo Evolution 300LC

Sistema de obtenção de água ultra pura Millipore, modelo Milli-Q Advantage

6.2.2. Material

Nesta secção descreve-se o material específico utilizado no presente estudo. Não se apresenta o material de uso corrente de laboratório.

- Cartuchos para extracção em fase sólida, Sílica gel, Strata SI - 1,55 µm, 70 Å, 500 mg/3 mL, Phenomenex
- Células de quartzo com percurso óptico de 1 cm
- Coluna analítica de HPLC, 250 x 4,6 mm x 5 µm, Synergi Hydro-RP C18, Phenomenex
- Filtros de seringa Acrodisc LC, 13 mm diâmetro, poro 0,45 µm, membrana em PVDF, PALL
- Filtros de seringa Acrodisc LC, 13 mm diâmetro, poro 0,45 µm, membrana em PVDF, Millipore
- Membranas para filtração de solventes para HPLC, filter type HV, 47 mm diâmetro, poro 0,45 µm, Millipore
- Membranas para filtração de solventes para HPLC, filter type Fluoropore, 47 mm diâmetro, poro 0,45 µm, Millipore
- Micropipetas de 200 µL e 1000 µL, Gilson

- Pré-coluna 4 x 3 mm i.d. Hydro-RP C18, Phenomenex
- Seringa de 100 µL, Exmire
- Seringa de 500 µL, Hamilton
- Seringa de 5000 µL, Hamilton
- Sistema de filtração de solventes constituído por copo de vidro, funil, pinça metálica e kitasato, Millipore
- Tubos de centrifuga, com rosca, PVC, 50 mL
- Tubos de vidro 16 x 100 mm para evaporador de corrente azoto Turbovap

Vials de 2 mL com tampa de rosca e septo de teflon pré-perfurado, para amostrador automático de HPLC, Waters Alliance 2695

6.3. Reagentes e soluções

6.3.1. Gerais

- Água ultrapura (Millipore)
- Acetonitrilo, (CH₃CN), para HPLC, RS Plus, Carlo Erba Reagents
- Acetato de etilo, (CH₃COOC₂H₅), para LC, Merck
- Ácido acético glacial 100%, (CH₃COOH), *p.a.*, Merck
- Ácido perclórico 60%, (HClO₄), *p.a.*, Merck
- Areia do mar purificada com ácido e calcinada, grão fino, (SiO₂), Merck
- Etanol absoluto, (CH₃CH₂OH), para LC, Merck
- n-Hexano, (C₆H₁₄), Lichrosolv, Merck
- Sulfato de sódio anidro, (Na₂SO₄), *p.a.*, Merck
- Hidrogenocarbonato de sódio, (NaHCO₃), *p.a.*, Merck

Nota: O acetonitrilo é filtrado através de membrana filtrante para soluções orgânicas (tipo fluoropore), de poro 0,45 µm, usando o sistema de filtração Millipore ligado a bomba de vácuo.

6.3.2. Padrões

- 5-Hidroximetilfurfural (HMF), (C₆H₆O₃), > 99%, Sigma
- Patulina (4-hidroxi-4H-furo (3,2-c)pirano-2(6H)-ona, ≥ 98% (TLC), Sigma

6.3.3. Soluções

Todas as soluções são preparadas e armazenadas em material de vidro. As soluções são armazenadas ao abrigo da luz e a uma temperatura entre 5 ± 3 °C.

6.3.3.1. Soluções gerais

Água a pH=4

Ajustar a água ultrapura a pH=4 com ácido acético (0,2%). Guardar em frasco de vidro, a 5 ± 3 °C.

Ácido acético em acetato de etilo

Adicionar 3 mL de ácido acético glacial 100% a 97 mL de acetato de etilo. Misturar e guardar em frasco de vidro rolhado.

Ácido acético 0,2%

Medir 0,5 mL de ácido acético glacial para balão de 250 mL. Completar com água ultra-pura.

Solução de extracção acetato de etilo-n-hexano (60+40, v/v)

Misturar 180 mL de acetato etilo com 120 mL de n-hexano. Guardar em frasco de vidro rolhado.

Fase móvel para HPLC

Medir 940 mL de água ultrapura. Adicionar 60 mL de acetonitrilo e 1 mL de ácido perclórico a 60 %. Misturar. Filtrar através de membrana filtrante para soluções aquosas (tipo HV), de poro 0,45 µm, usando o sistema de filtração Millipore ligado a bomba de vácuo.

Solução de NaOH 0,01 M

Pesar rigorosamente cerca de 4 g de NaOH. Transferir para balão volumétrico de 100 mL, dissolver e completar com água ultrapura. Diluir 1 mL desta solução para 100 mL com água ultrapura.

Solução de hipoclorito de sódio a 1,3%

Adicionar 2 L de hipoclorito de sódio a 2% a 1 L de água da torneira.

6.3.3.2. Soluções de calibração

Solução mãe de calibração (± 200 mg/L)

Medir 5 mL de acetato de etilo com o auxílio de uma seringa Hamilton e transferir para o frasco fechado contendo patulina, perfurando o septo de borracha que constitui a tampa do referido frasco. Agitar. Abrir o frasco, transferir o seu conteúdo para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com acetato etilo. Armazenar esta solução em frascos de vidro com tampa de rosca a -20 °C. Esta solução é estável durante 6 meses. A concentração da solução é aferida em cada utilização de acordo com o procedimento descrito para a solução padrão de calibração.

Solução padrão de calibração (± 10 mg/L)

Evaporar 1 mL da solução mãe de patulina (± 200 mg/L) até à secura sob corrente de azoto. Dissolver o resíduo em cerca de 5 mL de etanol. Transferir para balão de 20 mL e completar com o mesmo solvente. Armazenar a -20 °C. Determinar a concentração da solução de patulina por espectrofotometria ($\lambda=276$ nm). Traçar o espectro de absorvência das soluções entre 350 e 250 nm numa célula de quartzo de 1 cm, usando etanol como branco. Aferir a concentração da solução de patulina (C) usando a equação:

$$C = A_{\max} \times PM \times \frac{100}{\epsilon} \times \delta$$

Em que:

- C concentração de patulina, mg/L
- A_{\max} absorvência da solução de patulina no comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvência ($\cong 276$ nm)
- PM peso molecular da patulina (154,12 g/mol)
- ϵ coeficiente de absorção molecular para a solução de patulina a 276 nm ($1460 \text{ m}^2/\text{mol}$ em etanol)
- δ percurso óptico da célula, em cm

6.3.3.3. Soluções padrão de fortificação

Solução mãe de fortificação (± 200 mg/L)

O padrão de patulina utilizado para preparar esta solução deve ser de um lote diferente do da calibração ou corresponder a uma nova pesagem. Preparar como referido para a solução mãe de calibração.

Solução padrão intermédia de fortificação (± 10 mg/L)

Evaporar 1 mL da solução mãe de fortificação (± 200 mg/L) até à secura sob corrente de azoto. Dissolver o resíduo em cerca de 5 mL de etanol. Transferir para balão de 20 mL e completar com o mesmo solvente. Armazenar a -20 °C. Aferir a solução de acordo com o procedimento descrito em 3.2. (aferição da solução padrão de calibração).

Solução padrão de fortificação (± 1 mg/L)

A partir da solução padrão intermédia de fortificação efectuar uma diluição 1:10 em água a pH=4.

6.3.3.4. Soluções padrão de controlo

As soluções mãe de controlo (± 200 mg/L), solução padrão intermédia de controlo (± 10 mg/L) e solução padrão de controlo (± 1 mg/L) são as mesmas das respectivas soluções de fortificação.

6.3.3.4.1. Controlos cromatográficos

Solução controlo 1 de patulina (± 8 µg/L)

Medir ± 40 µL de solução padrão intermédia de controlo (10 mg/L) para balão volumétrico de 50 mL e completar com água pH=4.

Solução controlo 2 de patulina (± 25 µg/L)

Medir ± 120 µL de solução padrão intermédia de controlo (10 mg/L) para balão volumétrico de 50 mL e completar com água pH=4.

6.3.3.4.2. Controlos de fortificação

Solução controlo de fortificação de patulina (± 40 µg/L)

Medir 0,4 mL de solução de fortificação a 1 mg/L para balão de 10 mL. Completar com água pH=4.

6.4. Procedimento

6.4.1. Pesagem da amostra

Pesar rigorosamente cerca de 10 g de amostra para tubo de centrífuga de 50 mL. Em caso de amostras líquidas em que o resultado final deve ser dado em $\mu\text{g/L}$, a toma de ensaio deve ser de 10 mL em vez de 10 g. No caso de amostras líquidas, anotar também o peso.

No caso dos estudos de recuperação, pesar rigorosamente 10 g de amostra (puré ou sumo) em tubo de centrífuga de 50 mL. Adicionar 200 μL da solução padrão de fortificação 1 $\mu\text{g/mL}$ tendo o cuidado de depositar a solução sobre a amostra, evitando tocar nas paredes do tubo. Agitar a mistura amostra+padrão no vortex durante 3 minutos para completa homogeneização.

6.4.2. Extracção

Adicionar a um tubo de centrífuga limpo, 2g areia, 15,0 g de Na_2SO_4 e 2g de NaHCO_3 . Agitar, adicionar 10 mL de solvente de extracção, acetato de etilo + n-hexano (60+40, v/v) e fechar bem. O tubo de centrífuga está agora pronto para análise.

Transferir o conteúdo do tubo preparado anteriormente para o tubo de centrífuga que contém a amostra, com auxílio de um funil de bucal largo. Agitar vigorosamente com a mão durante alguns segundos e depois exactamente durante 5 minutos num agitador mecânico.

Centrifugar a mistura a baixa velocidade (1850 rpm ou 300-400 g) durante 1 minuto para promover a separação das 2 camadas.

Nota: a patulina não é estável em soluções alcalinas (i.e hidrogenocarbonato de sódio) pelo que esta etapa do método deve ser efectuada tão rápida quanto possível para evitar perdas.

6.4.3. Purificação do extracto por SPE

Adicionar 50 μL de ácido acético em acetato de etilo a um tubo de vidro com tampa de rosca de 10 mL e colocá-lo debaixo de um cartucho de SPE de sílica gel (não condicionado).

Após extracção transferir imeditamente 2,5 mL de extracto centrifugado para o cartucho e deixar eluir para o tubo de vidro de 10mL, gota a gota (*i.e.* pela força da gravidade).

Eluir a patulina do cartucho de SPE com 3mL da mistura de acetato de etilo + n-hexano (60+40 v/v). Após passagem da maior parte da solução de lavagem, forçar a saída do restante solvente para o tubo, ligando a bomba de vácuo durante alguns segundos.

Evaporar o eluído no Turbovap a 40 °C, 15 psi de azoto e durante aproximadamente 20 minutos.

Dissolver o resíduo com 1 mL de água pH=4. Agitar o tubo no vortex durante 3 minutos para assegurar que a patulina está totalmente redissolvida. Filtrar com filtros de seringa de PDVF (13 mm diâmetro, poro 0,45 µm) para o “vial” do injector. Analisar o extracto por HPLC-UV de acordo com as condições descritas em 4.2.3.

6.4.4. Análise cromatográfica

6.4.4.1. Condições cromatográficas

Na tabela 1 apresentam-se as condições analíticas utilizadas para a análise de patulina.

Tabela 1: Condições cromatográficas para a análise de patulina por HPLC-UV.

Parâmetro	Condições cromatográficas
Pré-coluna	C18, Phenomenex
Coluna cromatográfica	Fase reversa, Synergi RP C18, Phenomenex
Composição da fase móvel	Água:Acetonitrilo:Ácido perclórico (94:6:0,1)
Modo	Isocrático
Fluxo do eluente	1 mL/min
Temperatura da coluna	25 °C
Temperatura do amostrador	10 °C
Detector de díodos (UV)	Comprimento onda fixo, a 276 nm
Volume de injeção	200 µL

Após a análise de cada amostra é importante utilizar um programa de lavagem da coluna para eliminar possíveis interferentes. É igualmente importante equilibrar a coluna antes da injeção seguinte. Na tabela 2 apresenta-se o programa de lavagem e de equilíbrio da coluna entre injeções de amostra.

Tabela 2: Programa de lavagem e de equilíbrio da coluna entre injeções de amostra.

Tempo (min)	A (Fase móvel)	B (Acetonitrilo)	D (Água)
	100	0	0
3	0	100	0
4	0	100	0
9	0	65	35
10	0	65	35
11	100	0	0
30	100	0	0

6.4.4.2. Curva de calibração

Preparar uma série de padrões de patulina, entre 8 e 100 µg/L (gama de trabalho). Preparar, no mínimo, 5 soluções padrão. Traçar a curva de calibração (área vs concentração) e avaliar o coeficiente de determinação (R^2) da recta e o coeficiente de variação do método (CV_m).

A título de exemplo, a tabela 3 ilustra uma gama de concentração possível.

Tabela 3: Exemplo de gama de concentração possível para a curva de calibração da patulina.

Volume de sol. pad. patulina 10 mg/L (µL)	Concentração aprox. do padrão (µg/L)	Volume final (mL)
40	8	50
80	16	50
120	25	50
120	50	25
240	100	25

Medir rigorosamente um volume de solução padrão, o qual é ajustado em função da concentração desejada e do balão volumétrico utilizado.

6.4.5. Controlo de Qualidade Interno (CQI)

6.4.5.1. Duplicados

Preparar pelo menos um duplicado de uma amostra em cada série de trabalho.

No caso de se analisarem diferentes tipos de matriz na mesma série de trabalho, preparar pelo menos um duplicado de cada tipo de matriz por cada 20 amostras analisadas (sumo límpido, sumo turvo e puré).

6.4.5.2. Ensaio de recuperação

Preparar pelo menos uma amostra fortificada em cada série de trabalho.

No caso de se analisarem diferentes tipos de matriz na mesma série de trabalho, efectuar um ensaio de recuperação para cada tipo de matriz, por cada 20 amostras analisadas.

6.4.6. Critérios de aceitação

Os critérios de aceitação de duplicados são expressos em termos de diferença de duplicados, DD%, e apresentam critérios de aceitação variáveis de acordo com o nível de concentração (tabela 4).

Tabela 4: Critérios de aceitação de duplicados.

Teor de patulina	DD (%)
$\leq 10 \mu\text{g/kg}$	$< 30\%$
10-20 $\mu\text{g/kg}$	$< 20\%$
Entre 20 e 50 $\mu\text{g/kg}$	$< 10\%$

As curvas de calibração são aceites sempre que o coeficiente de determinação seja igual ou superior a 0,995 e o $CV_m \leq 10\%$.

Os resultados dos ensaios de recuperação devem cumprir os requisitos do Regulamento 401/2006.

6.5. Resultados

Identificar o pico da patulina comparando o tempo de retenção da patulina na amostra com o dos padrões da curva de calibração.

6.6. Cálculos

Determinar a concentração da patulina a partir da área do pico presente na amostra, e por interpolação na curva de calibração.

Calcular a concentração final em $\mu\text{g/kg}$ ou $\mu\text{g/L}$ presente na amostra utilizando a equação:

$$\text{Patulina } (\mu\text{g/kg}) = C (\mu\text{g/L}) \times \frac{v_3 (\text{mL}) \times v_1 (\text{mL})}{v_2 (\text{mL}) \times m_1 (\text{g})}$$

Se não houver alteração na massa de amostra, volume de solvente de extracção e alíquota de extracto, a equação pode ser expressa de forma abreviada:

$$\text{Patulina } (\mu\text{g/kg}) = C (\mu\text{g/L}) \times \frac{1 \times 10}{2,5 \times 10}$$

$$\text{Patulina } (\mu\text{g/kg}) = C (\mu\text{g/L}) \times 0,4$$

em que:

C Concentração da solução de ensaio calculada a partir da curva de calibração.

m_1 Massa da amostra utilizada para análise (10 g).

v_1 Volume de solvente de extracção (10 mL).

v_2 Alíquota para SPE (2,5 mL).

v_3 Volume de solução de água a pH=4 usada para dissolver o extracto (1 mL).

6.7. Apresentação dos resultados

A concentração de patulina nas amostras é expressa em $\mu\text{g}/\text{kg}$ (amostras sólidas) ou em $\mu\text{g}/\text{L}$ (amostras líquidas), apresentando, no máximo, 2 algarismos significativos.

6.8. Tratamento do material/ resíduos

- Sempre que possível usar material descartável que se coloca nos contentores amarelos com saco vermelho para incinerar. Todo o conteúdo líquido contaminado de balões volumétricos e tubos deve ser despejado no contentor para resíduos líquidos com a indicação de “contaminação biológica”.
- A descontaminação de tubos de vidro para evaporador, balões volumétricos e pipetas de vidro efectua-se com solução de hipoclorito de sódio 1,3%. Após 24h de contacto, colocar o material no alguidar para lavagem.
- Outro tipo de material, incluindo vials de HPLC, seringas de plástico, pipetas Pasteur de plástico e filtros seringa e tubos de centrifuga de plástico contaminados são colocados em saco vermelho para incinerar.
- Os funis e os tubos de centrífuga não contaminados são colocados no alguidar para lavagem normal.

Cálculo do teor de patulina nas amostras

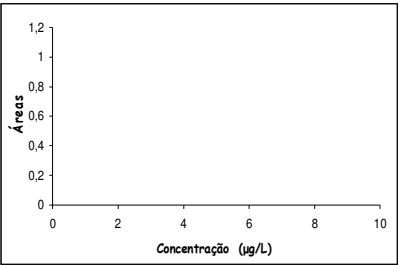
Data:

Sample Set:

Sol mãe	(mg/L)	0,00
Absorvência		

Curva de calibração

N	Alíquota (µL)	Conc. Padrão (µg/L)	Réplica (área)			Área média	DP	DPR (%)
			1	2	3			
1		8,00						
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								



Declive = #DIV/0!
Ord. Origem = #DIV/0!
Coef. Corr. = #DIV/0!
Coef. Deter. = #DIV/0!
Sy/x = #DIV/0!
DP = #DIV/0!
CV = #DIV/0! %

Limiares Provisórios

LD = #DIV/0! µg/mL
LQ = #DIV/0! µg/mL

Amostra (n°)												
Fortificação (µL)			200			200			200			200
Réplica	1	2	Fortificada	1	2	Fortificada	1	2	Fortificada	1	2	Fortificada
Amostra (g)	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10
Área 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Área 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média áreas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Solvente extração (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Factor diluição sol fortif.(1:x)			10			10			10			10
Conc. (ng/mL)												
Conc. (µg/kg)												
Factor diluição amostra (1:x)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)												
Media dos resultados (µg/kg)												
Recuperação(%)												
Conc. Corrigida (µg/kg)												
Conc. Média Corrigida (µg/kg)												

Anexo 10 - Folha de cálculo: Quantificação de patulina

Anexo 11 - Folha de cálculo: Curva de calibração

Curva de Calibração

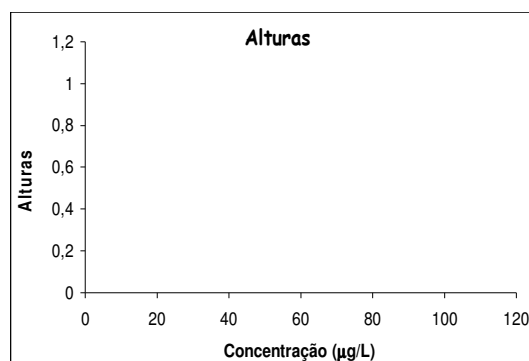
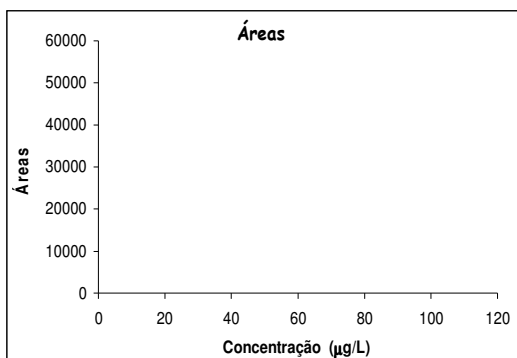
Patulina

Data:

Sample Set:

Sol Pad Cal (mg/L)	0,00
Absorvência	

N	Vol. (µL)	µg/L	Áreas	Alturas
1		8	10000	
2		16	20000	
3		25	25000	
4		50	50000	
5		100	10000	
6				
7				
8				
9				
10				



Declive =		Declive =	
Ord. Origem =		Ord. Origem =	
Coef. Corr. =		Coef. Corr. =	
Coef. Deter. =		Coef. Deter. =	
Sy/x =		Sy/x =	
DP =		DP =	
CV =	%	CV =	%
Limiares Provisórios		Limiares Provisórios	
LD =	0,00 µg/L	LD =	0,00 µg/L
LQ =	0,00 µg/L	LQ =	0,00 µg/L

Observações

Anexo 12 - Folha de cálculo: Áreas normalizadas

Teste das Áreas Normalizadas

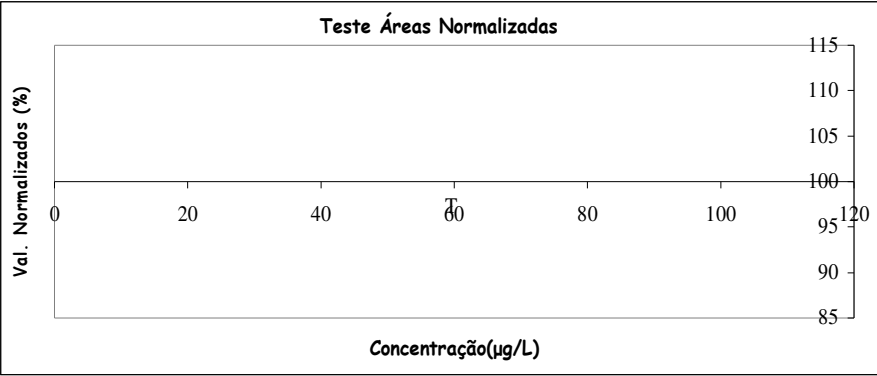
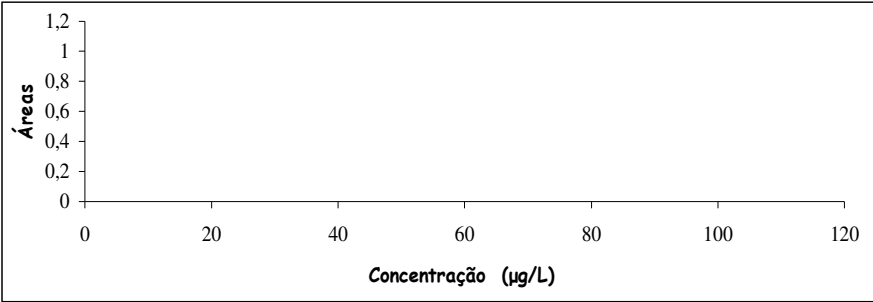
Patulina

Data:

Sample Set:

N	µg/L	Área exp	rea estimada	Área exp/área Est	Valores Normalizados
1	8	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
2	16	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
3	25	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
4	50	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
5	100	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
6		0	#DIV/0!	#DIV/0!	
7		0	#DIV/0!	#DIV/0!	
8		0	#DIV/0!	#DIV/0!	
9		0	#DIV/0!	#DIV/0!	
10		0	#DIV/0!	#DIV/0!	

Declive =
Ord. Origem =
Coef. Corr. =
Coef. Deter. =
Sy/x =
DP =
CV (%) = 0,00



Anexo 13 - Folha de cálculo: Análise de resíduos

Análise de Resíduos

Patulina

Data:

Sample Set:

N	µg/L	Área exp	Área estimada	Área exp/área Est	Desvio (%)
1	8		0	#DIV/0!	#DIV/0!
2	16		0	#DIV/0!	#DIV/0!
3	25		0	#DIV/0!	#DIV/0!
4	50		0	#DIV/0!	#DIV/0!
5	100		0	#DIV/0!	#DIV/0!
6			0	#DIV/0!	#DIV/0!
7			0	#DIV/0!	#DIV/0!
8			0	#DIV/0!	#DIV/0!
9			0	#DIV/0!	#DIV/0!
10			0	#DIV/0!	#DIV/0!

Declive =

Ord. Origem =

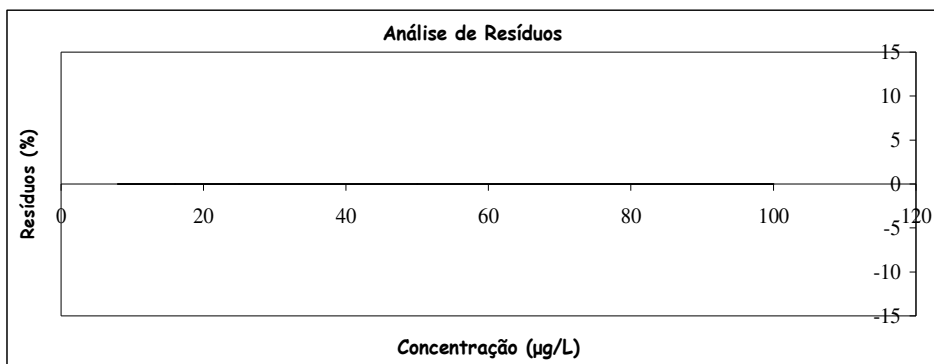
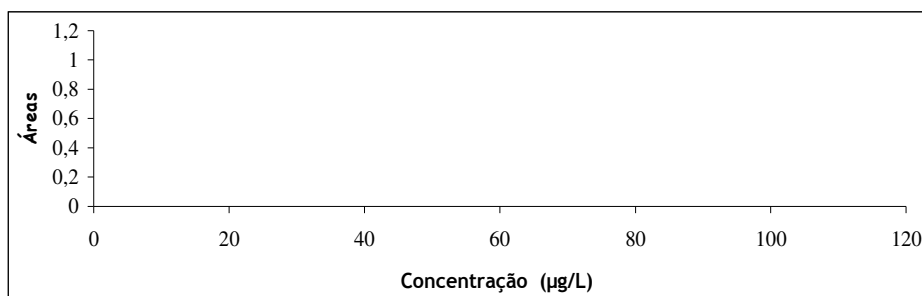
Coef. Corr. =

Coef. Deter. = 0,0000

Sy/x = #DIV/0!

DP = #DIV/0!

CV = #DIV/0! %



Anexo 14 - Folha de cálculo: Teste de RIKILT

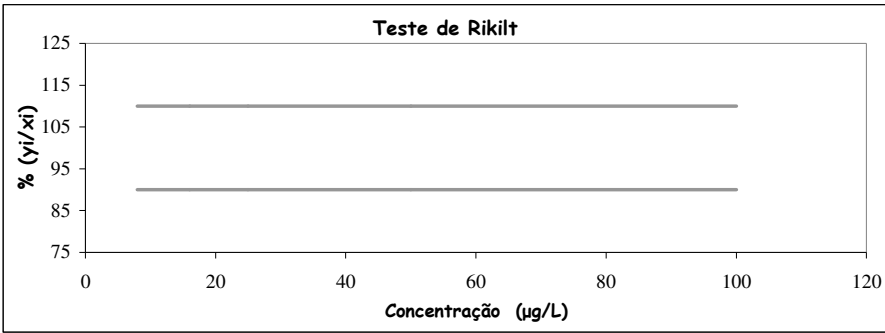
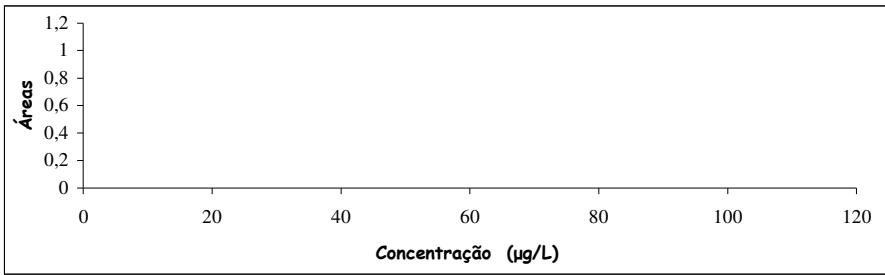
Teste de RIKILT

Patulina

Data:

Sample Set:

N	$\mu\text{g/L} = x_i$	Área= y_i	Razão y_i/x_i	% Razão y_i/x_i	LS	LI	Declive =
1	8		0	#DIV/0!	110	90	Ord. Origem =
2	16		0	#DIV/0!	110	90	Coef. Corr. =
3	25		0	#DIV/0!	110	90	Coef. Deter. =
4	50		0	#DIV/0!	110	90	Sy/x =
5	100		0	#DIV/0!	110	90	DP =
6			#DIV/0!	#DIV/0!	110	90	CV (%) = 0,00
7			#DIV/0!	#DIV/0!	110	90	
8			#DIV/0!	#DIV/0!	110	90	Limite Inferior - LI
9			#DIV/0!	#DIV/0!	110	90	Limite Superior - LS
10			#DIV/0!	#DIV/0!	110	90	
		Média	#DIV/0!				



Anexo 15 - Folha de cálculo: Teste de Mandel

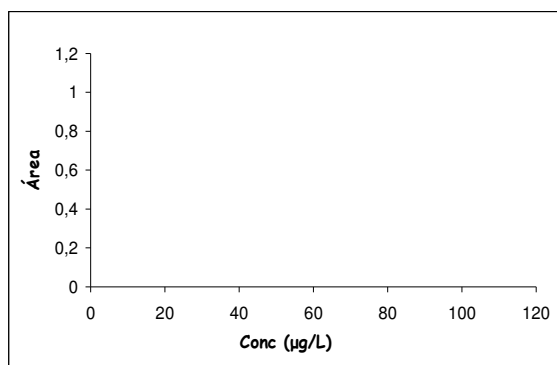
Teste de Mandel

Patulina

Data:
Sample Set:

N	µg/L	Áreas	Aj. Linear	(y-y _i) ²	Aj. Polin	(y-y _i) ²	Ajuste Linear
1	8		0	0		0	declive =
2	16		0	0		0	ord. origem =
3	25		0	0		0	coef. corr. =
4	50		0	0		0	coef. deter. =
5	100		0	0		0	S _{y/x} =
6			0	0		0	Limites Provisórios
7			0	0		0	LD = #DIV/0!
8			0				LQ = #DIV/0!
9							
10							

Soma	Soma
N-2	N-3
S _{y/x}	S _y ²



DS ² =	0
VT=	#DIV/0!
F (1,N-3) 95% =	#NÚM!

$$DS^2 = (N - 2) S_{y/x}^2 - (N - 3) S_{y/x(2^\circ)}^2$$

$$VT = DS^2 / S_{y/x(2^\circ)}^2$$

Conclusão

Anexo 16 - Folha de cálculo: Teste de homogeneidade de variâncias

Homogeneidade de variâncias

Patulina

Data:

Sample Set:

Concentração inferior: µg/L

Concentração superior: µg/L

N	Área 1	Área 2	Média	Área 1	Área 2	Média
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

N-1 =	-1
Média =	#DIV/0!
Desvio Padrão =	#DIV/0!
Desvio Relativo =	#DIV/0! (%)
Variância =	#DIV/0!

N-1 =	-1
Média =	#DIV/0!
Desvio Padrão =	#DIV/0!
Desvio Relativo =	#DIV/0! (%)
Variância =	#DIV/0!

VALOR TESTE (VT) = s^2_1 / s^2_2 se $s^2_1 > s^2_2$ ou $PG = s^2_2 / s^2_1$ se $s^2_2 > s^2_1$

F_{99%} = #NÚM!

Maior #DIV/0!

Menor #DIV/0!

VT = #DIV/0!

<u>Conclusão</u>

Anexo 17 - Folha de cálculo: Limiares analíticos (LOD e LOQ)

Limite de detecção e de quantificação-baseados na repetibilidade

Patulina

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Data:	Data:	Data:
Sample Set:	Sample Set:	Sample Set:

	Matriz		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
N	Área		
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

Média =	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Desvio Padrão=	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Desvio Padrão Relativo (DPR%)	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Equação da recta -Introduzir valores manualmente

Declive =

Ordenada na Origem=

Coef. determ=

A partir da equação da recta determinar a concentração estimada para cada área .

Concentração estimada a partir das Áreas

	Matriz		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
N	Concentração (µg/L)		
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

Média =	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Desvio Padrão (DP)=	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Desvio pad rel (DPR%) =	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

	Matriz		
	Concentração (µg/L)		
Limite de detecção	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Limite de quantificação	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Anexo 18 - Folha de cálculo: Limite de repetibilidade e
precisão intermédia

Limite da Repetibilidade e precisão intermédia

Patulina

5 ug/Kg (massa/massa)

Precisão intermédia

N	Conc. amostra ensaio 1	Conc. amostra ensaio 2	Conc. amostra ensaio 3	Conc. amostra ensaio 4	Conc. amostra ensaio 5	Média	SR	R	Xi-Xi-1	DPR (%)
1									#DIV/0!	
2									#DIV/0!	
3									0.0	
4									#REF!	
5						#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#REF!	#DIV/0!
6									0.0	
7									0.0	
8									0.0	
9									0.0	
10										
M	#DIV/0!	#DIV/0!								
Sri	#DIV/0!	#DIV/0!								
Cvri (%)	#DIV/0!	#DIV/0!								
r	#DIV/0!	#DIV/0!								
Xi-Xi-1										